MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo XXV Maio—1931 Fasciculo 2

Degeneração oxychromatica ("inclusões intranucleares") na febre amarella (*)

por

C. MAGARINOS TORRES

(Com as estampas XXVIII—XXX)

As memoraveis pesquizas de Stokes, Bauer e Hudson dando a conhecer a maneira segura de reproduzir a febre amarella em animaes de laboratorio, iniciaram uma phase verdadeiramente decisiva no estudo daquella molestia. Reaffirmaram ellas, em primeiro lugar, com abundancia de provas e contraprovas nunca dantes conseguidas, a doutrina segundo a qual o agente etiologico daquella affecção seria um virus filtravel e ultramicroscopico.

A rapida confirmação da descoberta dos autores americanos assegurou-lhe logo os fóros de verdade adquirida.

Não é nosso objectivo entrar no historico das pesquizas sobre a etiologia da febre amarella posteriores á descoberta de Stokes, Bauer e Hudson, mencionando apenas entre os mais proeminentes nessa primeira linha de estudos, os nomes de Aragão, Sellards e Hindle, Cunha e Muniz, Petit, Stefanopoulo e Frasey, Davis, Sawyer, Lloyd, Kitchen, Frobisher, etc.

Restabelecida em novas bases a doutrina etiologica da febre amarella, um problema magno se apresentava então, no dominio morphologico. Era elle: saber se, no grupo das doenças de virus filtravel, seria ou

(*) Recebido para publicação a 11 de Junho de 1930.

não a febre amarella uma affecção capaz de occasionar alterações peculiares e especificas da natureza das reconhecidas na raiva, vaccina, herpes, variola, epithelioma contagioso das aves, etc.

Tendo elle em vista, foi com grande interesse que iniciamos o estudo dos tecidos de *Macacus rhesus* infectados pelo virus da febre amarella isolado por H. de Beaurepaire Aragão de casos humanos da epidemia occorrida em 1928 no Rio de Janeiro, Brasil.

Assim, em communicações apresentadas á Société Brésilienne de Biologie, nas sessões de 24 de Junho e de 29 de Julho de 1928 assignalavamos em um macaco morto cinco dias depois de inoculado com sangue de um doente de febre amarella a descoberta de inclusões intranucleares caracteristicas. Na primeira nota publicada nos Comptes Rendus de la Société de Biologie, referimos:

«La présence, dans le noyau des cellules du foie, d'inclusions acidophiles de même nature que celles qui ont été signalées dans l'herpès simplex, l'herpès symptomatique, la varicelle et le virus III du lapin, et décrites, parfois, sous le nom de dégénérescence oxychromatique». (Torres, 1928a).

Em notas apresentadas á Société Brésilienne de Biologie, nas sessões de 15 e 29 de Agosto, 14 e 26 de Setembro, assignalamos a hyperplasia dos nucleos attingidos pela degeneração oxychromatica e a conveniencia della distinguir estadios precoces de necrobiose das cellulas do figado encontrados quer em macacos inoculados, quer nos não inoculados (Torres, 1928 b), a occurrencia da degeneração oxychromatica em *M. cynomolgus*, a sua ausencia em macacos não inoculados (Torres, 1928 c), a abundancia de cellulas hepaticas com degeneração oxychromatica em animaes injectados com amostras brasileiras e examinados entre o 6º e o 10º dia de inoculação e a sua desapparição gradual posterior (Torres, 1928 d), e, finalmente a importancia das inclusões intranucleares no diagnostico histopathologico da febre amarella em macacos inoculados com o virus brasileiro e nos quaes a não existencia das lesões descriptas como typicas por Stokes, Bauer e Hudson teria levado a rejeitar esses animaes como infectados pelo virus (Torres, 1928 h).

No Brasil Medico de 8 de Setembro de 1928 dizemos:

«Our results suggest the believe that yellow fever is a filterable virus disease in which typical inclusions are found only inside the nucleus (acidophilic intranuclear inclusions) as is the case with herpès zoster, symptomatic herpès, varicella and virus III infection of rabbits». (Torres, 1928f).

As conclusões dessas notas são reunidas em artigos publicados em Setembro de 1928 na Sciencia Medica (Torres, 1928 e) e em Outubro de

1928 no Supplemento das Memorias do Instituto Oswaldo Cruz (Torres, 1928 i).

Em 3 artigos publicados em Outubro de 1928, Hudson expõe a pathologia macroscopica, microscopica e comparada da febre amarella experimental baseando-a no estudo de sessenta e oito *Macacus rhesus* inoculados com a amostra africana «Asibi». Trancrevemos o que diz sobre as alterações do nucleo das cellulas do figado:

«Nuclear changes coincide with the changes of the cytoplasm. Large, poorly stained, vesicular nuclei with prominent nucleoli are found in the necrobiotic liver cells. In such nuclei, minute, dull red granules are often found. They were present in half the thirty specimens studied; in an additional six specimens, this type of nuclear change is less often present. Occurring in half the livers of this group, variable numbers of nuclei appear as small, round, intensely acidophilic dots. This form of degeneration is usually seen in the comparatively rare, small liver cell having smooth, intensely stained cytoplasm. The nucleus finally disappears in advanced necrotic cells either by lysis or karyorrhexis. In eleven specimens, karyorrhexis is common or marked, while in five others it occurs relatively infrequently. When karyorrhexis is marked, scattered nuclear débris is conspicuous in the hepatic cells throughout the section. Mitosis is not found». (Hudson, 1928b).

Esta descripção não differe, de modo essencial, do que se encontra no trabalho inicial de Stokes, Bauer e Hudson a proposito das alterações nucleares das cellulas do figado em macacos infectados, conforme se vê pela transcripção que fazemos:

«The extent of necrosis varied from a definitely limited midzone to a wide band of altered cells leaving only a fringe of non-necrotic cells about the portal area and central vein; sometimes even the central cells were acidophilic and granular. Necrosis of either the periportal or central areas alone was found in no specimen. The nuclei of the degenerated cells varied from being completely absent. Karyorrhexis was a common finding, and often the nuclei were small, round, and intensely eosinophilic. In some specimens the nuclei of altered cells contained peculiar small acidophilic granules. Mitotic figures were not seen». (Stokes, Bauer e Hudson, 1928).

Em nota apresentada á Société Brésilienne de Biologie na sessão de 26 de Dezembro de 1928 dizemos que a reacção nuclear de Feulgen negativa mostra que as inclusões nucleares possuem composição diversa da chromatina; notamos, além disso, o aspecto nitidamente diverso que apresentam nos preparados pelo methodo de Goodpasture, os nucleolos que se coram em vermelho e as inclusões nucleares, em azul violeta:

«Dans les noyaux ou celles-ci sont peu abondantes et divisées en deux ou trois corpuscules (stades initiaux), cette méthode révèle une structure réticulaire

très nette de ces corpuscules (inclusions nucléaires). Lorsque, dans la même préparation, on examine aussi les noyaux sans inclusions, on est tenté d'interpréter ces formations comme résultant d'une coagulation ou précipitation du nucleoplasme, l'acidophilie et la structure réticulaire des inclusions étant plutôt des arguments favorables à cette interprétation». (Torres, 1928 j).

Em artigo publicado em Março de 1929 no Supplemento nº 6 das Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, assignalamos differenças no aspecto das inclusões nucleares nos animaes inoculados com amostras brasileiras e africanas explicaveis por differenças na virulencia e adaptação ao macaco. Em uma estampa colorida representamos o nucleolo distinctamente conservado ao lado das inclusões intranucleares e dellas topographicamente distincto mesmo nas phases terminaes da degeneração oxychromatica (Torres, 1929a).

Cowdry e Kitchen, em 1 de Março de 1929, assignalam a presença de inclusões intranucleares:

«Which bear a striking resemblance to those of Torres, in the liver cells of eight *Macacus rhesus* monkeys infected with the West African virus of yellow fever. They also occur, though less abundantly, in the suprarenal gland». Verificaram que «the inclusions are present as such in the living animal and do not in any sense represent the coagulating action of the fixative».

Assignalam ainda mais, o seguinte facto importante:

«Intranuclear inclusions like those seen in the monkey tissues were found in 22 of the total of 25» casos humanos de febre amarella examinados. (Cowdry e Kitchen, 1929).

Hindle, em artigo publicado a 9 de Março de 1929, diz:

«The oxychromatic changes in the nucleus result in the formation of acidophilic intranuclear bodies which Torres (1928) considers to be equivalent of those occurring in other diseases caused by filterable viruses, such as herpès, Virus III, etc.». (Hindle, 1929a).

Em 27 de Março de 1929 assignalamos a influencia do factor tempo e a da amostra de virus empregado sobre a apparição das inclusões nucleares; ao passo que ellas eram ausentes em macacos inoculados com a amostra brasileira mortos no 3º, por vezes no 5º e 6º dias de inoculação, eram constantemente presentes e ordinariamente abundantes em macacos *rhesus* infectados com a amostra africana, mortos no 3º, 4º, 5º, 6º, 7º e 9º dias (Torres, 1929 b).

No Brasil-Medico de 6 de Abril de 1929 assignalamos as inclusões especificas que anteriormente verificaramos no macaco, em um caso humano de febre amarella fallecido 40 horas após os primeiros symptomas:

«As recentes verificações vêm estabelecer de modo definitivo que a febre amarella, sendo uma doença produzida por um virus filtravel deve ser collocada no «karyo-oikon group» da classificação de Lipschütz». (Torres, 1929c).

Em 1929, Hoffmann escreve no volume III do tratado de Kolle, Kraus e Uhlenhuth:

«Magarinos Torres hat vor kurzem in Rio in der Leber gelbfieberkranker Affen Veränderungen an den Zellkernen gefunden, die denen ähnlich sind, die bei Herpès zoster, Varizellen und verwandten Krankheiten auftreten und unter dem Namen der «acidophilen intranuclearen Inklusionen» oder auch als «oxychromatische Degeneration» beschrieben sind»... «Uber das Vorkommen solcher Einschlüsse in der Leber des Gelbfieberkranken Menschen ist noch nichts veröffentlicht. Ich habe meine sehr gut Gefärbten Schnitte von zahlreichen Gelbfieberfällen daraufhin genau durchgemustert, aber nur in einem Fall offenbar die gleichen fremden Einschlüsse in den Kernen der Leberzellen feststellen können». (Hoffmann, 1929a).

Em abril e em junho de 1929 publicamos figuras das inclusões intranucleares em macacos inoculados com as amostras brasileira e africana (Torres, 1929 d) e em um caso humano de febre amarella (Torres, 1929 e).

Hindle, em Maio de 1929, em uma discussão sobre virus filtravel, diz:

«It may be argued that yellow fever is not due to a filterable virus, but it falls into line with most of the others. You get the same eosinophilic inclusions and also it is filterable...» (Hindle, 1929b).

Reproduzimos em Junho de 1929 uma figura com alterações do nucleolo da cellula hepatica na febre amarella do homem. Percebe-se claramente, quer pelas figuras, quer pela descripção que as acompanha, que granulos intranucleares corados pela phloxina originarios do nucleolo podem simular os corpusculos intranucleares especificos. Essas alterações constituem causa de erro na identificação das inclusões intranucleares no homem. (Torres, 1929 f).

Hindle e Stevenson em nota publicada em 25 de Junho de 1929, referem a demonstração de inclusões nucleares oxychromaticas em córtes de figado de um caso humano de febre amarella e de um *M. rhesus* infectado (Hindle e Stevenson, 1929).

Penna e Figueiredo, em 15 de Julho de 1929, assignalam as inclusões nucleares acidophilas em 12 figados de macacos inoculados com virus da febre amarella (Penna e Figueiredo, 1929).

Hoffmann, em Agosto de 1929, publica um artigo sobre «Einchlüsse in den Leberkernen beim menschlichen Gelbfieber», cujo resumo é o seguinte:

«In einem menschlichen Gelbfieberfall aus Westafrika wurden die Einchlüsse in den Kernen der Leberzellen nachgewiesen, die von M. Torres bei Gelbfieber affen beschrieben sind. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Einschlüssen um einen Entartungsvorgang des Kernes, aber es bleibt noch zu erforschen, ob der Ereger des Gelbfiebers für ihre Entstehung mit verantwortlich, vielleicht auch in ihnen versteckt ist». (Hoffmann, 1929b).

Pettit, em Outubro de 1929, escreve:

«Ces faits de structure se retrouvent dans les préparations de foies prélevés sur les *Macacus rhesus* morts de fièvre jaune et je ne puis que confirmer la parfaite exactitude des constatations de C. Torres. Toutefois, on notera que le processus, actuellement désigné sous le nom de dégénérescence oxychromatique, a été observé sous d'autres appellations par les histo-pathologistes en de nombreuses conditions pathologiques. Je l'ai signalé dans le foie d'animaux morts de trypanosomiasis...» (Petit, 1929).

Hoffmann, em Março de 1930:

«Last year C. Magarinos Torres of the Oswaldo Cruz Institute in Rio found certain inclusion bodies in the nuclei of the liver cells of Rhesus monkeys experimentally infected with yellow fever. Through his kindness I had the opportunity to see his preparations and when I studied the sections which I have of numerous human cases, I shaw the same inclusions, though only in a few cases and in small numbers. But in one of them, a case from West Africa, they were as numerous as they are found in the liver of the monkeys, or in almost all the cells which are not attacked by the typical fatty or necrotic degeneration» (Hoffmann, 1930).

Cowdry e Kitchen publicam, em Março de 1930, extenso e detalhado estudo sobre as inclusões intranucleares na febre amarella. A comparação directa entre ellas e as do virus herpetico inoculado no figado de *Cebus hypoleucus*, a comparação indirecta com as inclusões no virus III, no virus submaxillar, na stomatite vesiculosa, na varicella e na doença de Borna, as reacções de coloração do nucleo nas cellulas hepaticas de macacos infectados, a descripção e o estudo microchimico das inclusões examinadas a fresco são alguns dos pontos mais interessantes referidos nesse importante artigo (Cowdry e Kitchen, 1930).

Finalmente, Theiler, descobrindo a receptividade do cammondongo ao virus da febre amarella, assignala nas cellulas nervosas, inclusões nucleares acidophilas semelhantes ás vistas na cellula hepatica (Theiler, 1930).

MATERIAL E TECHNICA

O material examinado é constituido:

1º—pelos tecidos, em muitos casos apenas o figado, de cento e dezoito *Macacus rhesus,* de tres *M. cynomolgus* e de um *M. speciosus* infectados com o virus da febre amarella. Oitenta e dois *M. rhesus* receberam a amostra africana Asibi. Trinta e seis *M. rhesus,* tres *M. cynomolgus* e um *M. speciosus* foram injectados com amostras sul-americanas; dentre estes, dezenove *M. rhesus* e dois *M. cynomolgus* receberam a amostra brasileira F. W. A origem da amostra africana é descripta no artigo de Sawyer, Lloyd e Kitchen (1929) e a da amostra sul-americana no de Davis e Burke (1929).

2º—pelos tecidos de dezesete casos humanos de febre amarella autopsiados no Rio de Janeiro, Brasil, durante a epidemia de 1928.

3º—pelos tecidos, especialmente o figado, de sete *M. rhesus* não inoculados.

4º—pelos tecidos, especialmente o figado, de treze *M. rhesus* injectados com material variado, como seja figado de doente de febre amarella, meios de Noguchi semeados (muitas passagens) com virus, cultura de *Bacillus typosus,* material de thrombo-endocardite parietal, etc.

5º—pelo figado de sete *Saimiri sciureus* injectados com virus da febre amarella.

6º—pelo figado de um cão intoxicado pelo phosphoro, de diversos cães inoculados com *Shizotrypanum cruzi* e de uma cobaya intoxicada pelo tetrachlorureto de carbono.

7º—pelos tecidos de quatro *Pseudocebus azarae* e de cinco coelhos inoculados com virus da febre amarella.

Obtivemos grande parte do material experimental por gentileza dos Drs. Carlos Chagas, H. de Beaurepaire Aragão, A. Marques da Cunha, J. Muniz, J. da Costa Cruz e J. Teixeira.

As autopsias foram realisadas por nós, pessoalmente, e, em alguns casos, em circumstancias especialmente favoraveis ao estudo histo-pathologico. Com effeito, em quatro casos, a autopsia foi iniciada vinte e tres, trinta, quarenta minutos e uma hora e dez minutos depois da morte. Foi possivel obter, na maioria dos casos, detalhadas informações sobre os symptomas clinicos e o periodo da molestia em que occorreu o obito. Ao corpo

clinico do Hospital Oswaldo Cruz, Drs. E. Chagas, A. Lobo e J. Teixeira, somos gratos pela collaboração prestada.

Foram usados os fixadores habituaes: liquido de Zenker com 5 por cento de acido acetico, Zenker-formol, fixador de Regaud, sublimado alcool de Schaudinn e formol a 10 por cento. Não notamos modificações nitidas no aspecto das inclusões attribuiveis ao fixador empregado. No material fixado em formol não obtivemos uma bôa coloração pela eosina e pela phloxine quer das inclusões, quer de outros componentes cellulares acidophilos, como geralmente acontece quando os tecidos permanecem muito tempo no formol. O inconveniente é diminuido quando a permanencia no formol é apenas de algumas horas.

Na maior parte dos tecidos estudados, o fixador usado foi o Helly ou o Zenker e o formol, sendo constantemente empregados dois fixadores como processo rotineiro.

O material foi incluido na parafina, sendo os cortes corados pela hematoxylina de Delafield e eosina, Bordeaux e hemalaun, azul polychromico de Unna, «Nuclealfärbung» segundo Feulgen, verde de methyla e pyronina de Pappenheim-Unna, phloxina, azul de methyleno alcalino de Unna, phloxina e azul de toluidina, fuchsina basica e azul de methyleno de Löffler e pelo methodo de Giemsa.

Reproduzimos o protocollo dos *M. rhesus* que serviram de contraprova. Não foram injectados no Instituto Oswaldo Cruz, nem com virus da febre amarella, nem com qualquer outro material. Os exemplares eram convenientemente alojados e alimentados desde que chegavam ao Instituto. Entretanto a mortalidade em alguns lotes recebidos foi, por vezes, elevada, os animaes mostrando signaes evidente de mau tratamento.

Apresentam interesse os protocollos reproduzidos porque em alguns delles, observamos certas alterações nucleares (figs. 42, 43, 44, 45, 46 e 47) que consideramos como «necrobiotic (non specific) nuclear changes» e como «early stages in necrobiosis of liver cells».

«Which were observed in injected, as well as in uninoculated animals. Special reference to them is made here on account of the presence inside the nucleus of eosin-staining substances». (Torres, 1929a).

Ellas são encontradas com facilidade no *rhesus* 2618, existindo tambem no *rhesus* 2655.

Mais tarde Cowdry e Kitchen acharam as mesmas alterações em um caso de avitaminose. Dizem a proposito:

«It is possible that the changes in some of Torres animals resulted in some way from the action of the yellow fever virus, for he does not make clear, which

of the experimental procedures mentioned called them forth» (Cowdry and Kitchen, 1930).

Os documentos que agora apresentamos permittem a conclusão de que taes alterações nucleares não tem relação directa com o virus da febre amarella. Todos os macacos, importados do extrangeiro, eram collocados em gaiolas a prova de mosquito, dentro de um compartimento com portas e janellas teladas e provido de porta-tambôr (installações do Dr. Aragão e dos Drs. Cunha e Muniz).

De facto encontramos tambem as referidas alterações nucleares em *M. rhesus* infectados, quaes o nº 24 C. Mn. (quadro VII, figs. 42, 46 e 47) morte precocemente sem symptomas, o nº 8 C. Mn. (quadro V, figs. 44 e 45) e o *M. rhesus* Ar. Tx. (quadro VII, fig. 43).

M. rhesus 2504 (28 de Junho de 1928). Importado pela Fundação Rockefeller no Brasil. Morto antes de inoculado (laboratorio do Dr. Aragão). A necropsia mostra um exemplar femea, adulto (velho ?), pesando 2250 grs., medindo 46 cms., da cabeça á base da cauda e 62 cms. da cabeça á extremidade da cauda.

Pesos e dimensões:

Figado	105 grs.
Baço	4 grs., medindo 4 × 2 × 1,5 mms.
Rim direito	12,5 grs., medindo 4 × 2,7 × 2 mms.
Rim esquerdo	11 grs., medindo 4 × 2,5 × 2 mms.

O figado excede o rebordo costal de 5 mms.. No peritoneo, 13 c.c. de liquido amarello claro, limpido. No pericardio, cerca de 5 c.c. de liquido claro. Ganglio lymphatico axillar esquerdo medindo 12 mms. no maior diametro.

Diagnostico anatomico: Tuberculose ulcerativa chronica do pulmão esquerdo. Pleurite tuberculosa esquerda. Lymphadenite caseosa peribronchica. Tuberculose miliar aguda do pulmão direito, do figado, do baço, dos rins e da medulla ossea. Exemplares de *Oesophagostomum* (segundo o Prof. L. Travassos) no intestino grosso. Material fixado em Zenker acetico.

Exame microscopico: Os córtes de figado mostram congestão, leve degeneração gordurosa, e fócos de necrose de caseificação com intensa exsudação cellular. Não ha folliculos tuberculosos typicos. A não ser nas areas de necrose, os nucleos das cellulas hepaticas são normaes e não mostram degeneração oxychromatica.

M. rhesus 2599 (2 de Agosto de 1928). Morto, possivelmente de frio, antes de ser inoculado (laboratorio do Dr. Aragão). A necropsia não

mostra lesões macroscopicas apparentes. Os córtes de figado revelam extensa degeneração gordurosa periporta e necrose das cellulas hepaticas. A necrose traduz-se por eosinophilia do cytoplasma e karyolyse do nucleo não diminuido de volume. Além disso, congestão e pequenas hemorrhagias. Não ha collecções pequenas de polymorphonucleares. Não ha degeneração oxychromatica nas cellulas hepaticas.

M. rhesus 2614 (5 de Agosto de 1928). Morto antes de inoculado (laboratorio dos Drs. Cunha e Muniz). A autopsia mostra um exemplar mal nutrido com numerosos nodulos parasitarios nos pulmões e grosso intestino; no figado, com extensa degeneração gordurosa, existe um nodulo solitario, circumscripto contendo um cestodio. Em nenhum orgão ha lesões suggestivas de tuberculose. Os córtes de figado mostram congestão e extensa degeneração gordurosa periporta. Não ha degeneração oxychromatica nem necrose evidente de cellulas hepaticas.

M. rhesus 2618 (10 de Agosto de 1928): Não inoculado. Morte expontanea (laboratorio do Dr. Aragão). A autopsia mostra um exemplar femea, jovem, bem nutrido, medindo 26 cms. da cabeça á base da cauda, pesando 1400 grs. *Conjunctivas pallidas, ganglios lymphaticos* superficiaes não augmentados; *peritoneo* parietal liso, humido e brilhante. Ambos os *pulmões* retrahidos, o pulmão direito adherindo ao diaphragma por adherencias firmes. Pela palpação não ha nodulos e a crepitação é presente. *Ganglios lymphaticos peribronchicos* não augmentados de volume. *Coração* normal, mostrando as cavidades direitas distendidas por coagulos sanguineos. Baço pequeno, firme, medindo 27 × 15 × 7 mms. A capsula é delgada, a superficie do córte é secca e cinzenta avermelhadas. Folliculos lymphoides reconheciveis mas não augmentados. Figado augmentado de volume, medindo 85 × 48 × 38 mms. Capsula delgada. Superficie do corte de côr violacea escura dando sahida a liquido sanguinolento; é esboçado o aspecto do figado «noz moscada». *Rins* de volume normal. O *rim* esquerdo mede 28 × 18 × 15 mms.; o direito, 28 × 18 × 15 mms. Ao corte, a camada cortical de côr amarella, pallida, é algum tanto alargada e tumefacta. A superficie do intestino grosso mostra diversos nodulos de côr cinzenta escura irregularmente esparsos.

Pesos:

Pulmão esquerdo	5 grs.
Rim esquerdo	4 grs.
Baço	2 grs.
Coração	9 grs.,5
Pulmão direito	5 grs.,5
Rim direito	4 grs.
Figado	62 grs.

Diagnostico anatomico: Nodulos parasitarios no intestino grosso. Congestão e degeneração gordurosa do figado. Degeneração dos rins. Pleurite fibrosa chronica adhesiva direita.

Exame microscopico: Os cortes de figado mostram congestão chronica passiva e extensa degeneração gordurosa periporta. Não ha necrose nas cellulas hepaticas, necrose traduzida por elementos arredondados, isolados, com cytoplasma acidophilo. Não obstante, em numero mais ou menos notavel de cellulas hepaticas, os nucleos apresentam uma coloração azul diffusa do nucleoplasma com lyse apparente da basichromatina intranuclear e bem assim alterações especiaes do nucleolo e a presença de substancias intranucleares coradas pela eosina, aspecto semelhante ao representado nas figs. 42 a 47.

M. rhesus 2638 (16 de Agosto de 1928). Não inoculado. Encontrado morto pela manhã (laboratorio dos Drs. Cunha e Muniz). A necropsia, realisada ás 14 hs., mostra um exemplar jovem, femea, mal nutrido, medindo 33 cms., 5 da cabeça á base da cauda, pesando 860 grs. Dentes pequenos e bem conservados. Ao corte, o tecido gorduroso subcutaneo é muito reduzido, quasi desapparecido. *Peritoneo* liso e brilhante. *Pulmões* retrahidos e livres de adherencias. No lobo superior e porção superior do lobo inferior do pulmão esquerdo, existem 5 a 6 pequenos nodulos parasitarios, amarellados, proeminentes, circumscriptos. Nodulos semelhantes existem tambem na superficie do lobo inferior do pulmão direito. A superficie do corte é secca e de côr rosea, não mostrando areas de consolidação. *Ganglios lymphaticos peribronchicos* não augmentados. Nas cavidades cardiacas, coagulos firmes de côr vermelha acinzentada. *Baço* mede 30 × 15 × 6 mms. A superficie do corte é secca, de côr vermelha acinzentada pallida; os folliculos lymphoides são pequenos e vistos com difficuldade; o tecido intersticial parece normal. *Rim esquerdo* mede 26 × 15 × 12 mms. e o direito 26 × 16 × 12 mms. Em ambos, a superficie do corte é de côr vermelha acinzentada e a camada cortical algum tanto tumefacta. A tunica interna da aorta é lisa e levemente amarellada. *Ganglios lymphaticos mesentericos* com a forma e dimensões de grãos de arroz. *Figado* de côr vermelha acinzentada escura, com manchas violaceas, tendo a superficie do corte a mesma coloração e dando sahida a algum sangue. O conteudo de gordura não é augmentado de modo apparente.

Pesos:

Pulmão esquerdo	2 grs.
Rim esquerdo	2 grs.

Baço	1 gr.
Coração	3 grs.
Pulmão direito	2 grs.
Rim direito	2 grs.
Figado	31 grs.

Diagnostico anatomico: Congestão do figado. Degeneração dos rins. Nodulos parasitarios (numerosos) em ambos os pulmões. Cachexia (desnutrição ?).

Exame microscopico: Os cortes de figado apresentam pronunciada congestão. As cellulas hepaticas não mostram degeneração oxychromatica, nem degeneração gordurosa nem necrose evidentes.

M. rhesus 2655 (22 de Agosto de 1928). Não inoculado. Encontrado morto pela manhã (laboratorio dos Drs. Cunha e Muniz). A necropsia, realisada ás 14 horas, mostra um exemplar macho, pequeno, mal nutrido, pesando 1200 grs. e medindo 37 cms., 5 da cabeça á base da cauda. Os pulmões não mostram tuberculose, bronchopneumonia, nodulos parasitarios nem pleurite fibrosa chronica. No coração, dilatação da auricula e coagulos vermelhos escuros nas cavidades. Não ha hemorrhagias, nem nas serosas, nem no parenchyma pulmonar. Nodulos parasitarios nas paredes do intestino grosso. Baço mede $35 \times 16 \times 7$ mms. *Figado* de côr vermelha acinzentada escura com uma grande mancha violacea na face antero superior. A superficie do corte mostra congestão chronica passiva. O *rim direito* mede $26 \times 18 \times 13$ mms.

Pesos:

Pulmão esquerdo	5 grs.
Rim esquerdo	5 grs.
Baço	2 grs.
Coração (sem coagulos)	7 grs.
Pulmão direito	5 grs.
Rim direito	5 grs.
Figado	38 grs.

Diagnostico anatomico: Congestão chronica passiva e degeneração gordurosa do figado. Nodulos parasitarios nas paredes do intestino grosso. Desnutrição (?).

Exame microscopico: Os cortes de figado mostram congestão e extensa degeneração gordurosa periporta. A disposição das traves hepaticas acha-se modificada: em muitos pontos apparecem cellulas isoladas, como que dissociadas. A necrose das cellulas hepaticas traduz-se por pycnose

do nucleo (muito frequente) e acidophilia do cytoplasma. Em algumas cellulas, os nucleos mostram chromatolyse e coloração azul do nucleoplasma. Não ha cellulas hepaticas com degeneração oxychromatica.

MORPHOLOGIA DAS INCLUSÕES NOS MACACOS INFECTADOS

Cowdry (1928) acha conveniente designar as formações cellulares especificas das doenças produzidas por virus filtraveis pelo nome de «corpusculos x», imitando o proceder dos botanicos em relação a estructuras cellulares cuja composição permanece obscura.

E' geralmente acceito que taes «corpusculos x» representam, em parte seguramente, «productos de reacção» formados á custa de porções componentes da propria cellula. Goodpasture (1925 b), em estudo experimental sobre a raiva conclue achando que, no coelho, os «lyssa bodies» e os corpusculos de Negri, em parte, provem de alterações das neurofibrillas e do chondrioma da cellula nervosa.

Na febre amarella «it seems evident fever the material which constitutes the yellow fever «inclusions» may partially at least be composed of coagulated nucleoplasm, being surely of a different structure and composition from the two nuclear constituents, chromatin and nucleolus» (Torres, 1929a).

Embora julguemos as «inclusões intranucleares» da febre amarella simplesmente um processo degenerativo especifico, usaremos muitas vezes, por commodidade de expressão, do termo «inclusões».

Só podemos dar conta do que observamos em material submettido á acção dos fixadores usuaes e no qual teremos forçosamente a considerar um reticulo (a «linina» dos antigos histologistas), a basichromatina, a oxychromatina, etc.

Assim sendo, tendo Cowdry e Kitchen (1929 e 1930) verificado que os corpusculos existem na cellula viva e não representam um artefacto, o exame dos preparados fixados permitte affirmar que se nelles, agora, elles representam um artefacto, este possue caracteristicas assaz uniformes e fixas. Isso justifica um estudo accurado em taes condições.

E' indispensavel fazer referencia ao aspecto que o nucleo normal da cellula hepatica apresenta quando corado pelo processo de coloração usado no estudo das inclusões. Com effeito, tal aspecto é variavel, não só conforme a especie animal, como segundo o methodo de coloração usado.

Assim, no *Hapale pencillata,* no cão e na gallinha, a oxychromatina é assaz conspicua, sendo vista em preparações coradas pela hematoxylina-eosina. No *Macacus rhesus,* porém, a oxychromatina é escassa e nem sempre vista nos cortes corados pela hematoxylina-eosina. E' posta, com mais

facilidade, em evidencia nos preparados corados pela phloxina e azul de toluidina (fig. 66).

E' possivel que a oxychromatina varie de quantidade no nucleo normal, de animal para animal, e talvez, conforme a edade do exemplar.

Com effeito, Buehler, « étudiant la chromaticité des noyaux dans les cellules nerveuses, a vu que les jeunes cellules des embryons ont un noyau riche en basichromatine, que l'oxychromatine y parait ensuite et augmente de quantité avec l'âge» (Prenant, Bouin et Maillard, 1904).

Quer a forma, quer as dimensões do nucleo normal da cellula hepatica do *M. rhesus* tomadas nos cortes histologicos de espessura media de 6 apresentam sensiveis variações.

Assim, conforme a orientação do corte, a fórma do nucleo é, ora redonda, ora ligeiramente oval; esta ultima é a que elles geralmente apresentam geralmente no corte.

Variações ligadas ao plano do corte mostram egualmente as tomadas em diversos nucleos colhidos ao acaso em um mesmo corte:

nucleo	I —	10×6 μ
»	II —	$9 \times 6{,}5$ μ
»	III —	$9 \times 6{,}5$ μ
	IV —	9×6 μ
	V —	9×6 μ
	VI —	8×6 μ
»	VII —	8×5 μ
	VIII —	$7 \times 5{,}5$ μ
»	IX —	7×5 μ
	X —	5×5 μ

Em cortes corados pela phloxina e azul de toluidina, a membrana nuclear cora-se em azul escuro com particulas de basichromatina nella encrustadas; não é raro ver-se uma dessas particulas mais volumosa que as outras (fig. 66).

O reticulo de linina cora-se em violeta claro e insere-se sobre a membrana nuclear. Apresenta particulas de basichromatina mais intensamente coradas em violeta regularmente distribuidas pelo reticulo de linina, situadas, apparentemente, nos pontos de intersecção do reticulo (fig. 66). As malhas do reticulo de linina são assaz regulares em suas dimensões.

Na maior parte dos nucleos existem algumas particulas de basichromatina mais volumosas que as outras e situadas mais proximo da membrana nuclear do que da porção central do nucleo (figs. 1, 2 e 12).

As outras particulas menores, de fórma irregular, apresentam tambem uniformidade notavel de dimensões (figs. 2 e 66).

A oxychromatina apresenta-se sob a fórma de massas homogeneas, de extensão variavel e limites por vezes difficeis de precisar; coram-se de modo nitido pela phloxina e com diversa intensidade no mesmo nucleo. A sua sede mais constante é a proximidade da membrana nuclear e do nucleolo.

A oxychromatina no nucleo normal tambem se encontra no nucleoplasma em zona intermediaria entre membrana nuclear e nucleolo; *ella simula, não raro, quando os preparados são examinados com Obj. imm. 1/12, 100 × e Oc. periplan. 4 × Leitz, granulos acidophilos ou filamentos acidophilos.*

Insistimos, de proposito, nesse aspecto de granulos e de filamentos que parece ter a oxychromatina no nucleo normal, quando examinado com aquelle augmento, porque elle se modifica quando as mesmas estructuras, no mesmo nucleo, são examinadas com Obj. imm. 1/12, 100 × Leitz e Oc. periplan. 25 × B, Leitz, empregando como illuminação a luz branca da «Speziallampe» Leitz de baixa tensão, «Nitra» (6 volts, 6 amp.). Vê-se então que o «granulo» corresponde a uma area mais ou menos irregular de oxychromatina preenchendo uma ou mais malhas do reticulo de linina (v. fig. 66). Quanto aos filamentos, elles nada mais são do que porções do reticulo de linina em cuja visinhança immediata se condensou estreita orla de oxychromatina.

Assim, repetimos: examinado com 500-800 diametros, o nucleo da cellula hepatica normal apresenta, por vezes, filamentos de oxychromatina, bem como granulos acidophilos; elles são, porém, um falso aspecto, conforme demonstra o exame com illuminação artificial (luz branca) e augmento de 2000-2500 diametros.

Em taes condições, verifica-se uma substancia acidophila occupando as malhas do reticulo de linina ou a visinhança de filamentos do reticulo.

O nucleoplasma que occupa as malhas do reticulo de linina é transparente e sem estructuras, nas zonas onde não existe oxychromatina.

O nucleolo geralmente unico, é quasi sempre excentrico (figs. 1, 2, 12 e 66). A sua estructura é melhor evidenciada nos preparados corados pela phloxina-azul de toluidina. De fórma levemente irregular, elle é formado de duas substancias distinctas (fig. 66): uma, mais intensamente corada em azul escuro, occupa as suas margens onde constitue duas ou tres particulas de contornos irregulares, ás vezes formando estreita faixa ou orla na peripheria do nucleolo. A porção restante do nucleolo cora-se mais fracamente e de modo homogeneo, tingindo-se em uma bella

côr azul da Prussia pelo methodo acima referido (figs. 50 e 51); é ella que constitue a porção consideravel do nucleolo e toda a sua zona central.

As primeiras modificações no nucleo em que se formam as inclusões da febre amarella constam da apparição simultanea, em dois, tres e mais pontos do nucleoplasma (figs. 4, 5, 13, 19, 26, 27 e 70), nas malhas do reticulo de linina, de uma nucleoproteina basica que se cora em carmim pelo bordo e em roseo pela eosina e phloxina. No inicio tal substancia deve corresponder, provavelmente, a um augmento da oxychromatina do nucleo normal; quando, porém, em estadios mais avançados, a sua quantidade se torna consideravel, é provavel que ella seja formada tambem, por outras nucleoproteinas acidophilas não visiveis no nucleo normal. E', assim, provavel que a substancia intranuclear acidophila que entra na formação das inclusões da febre amarella não seja uma unica especie de nucleoproteina, mas uma mistura de nucleoproteinas derivadas do nucleoplasma em condições anormaes.

Tal substancia acidophila geralmente não constitue uma substancia corada de modo homogeneo e uniforme; nos preparados pela phloxina e azul de toluidina, em outras porções a côr é roseo avermelhado, em outras roseo amarellado ou côr de laranja (figs. 70 e 71).

E' importante, para a comprehensão da natureza das alterações nucleares de que nos occupamos, estabelecer, com precisão, as relações que, de inicio, taes modificações nucleares especificas apresentam com as estructuras ou artefactos provenientes da acção dos fixadores.

No inicio, as massas atraz mencionadas de nucleo-proteinas acidophilas estão situadas apenas dentro de algumas malhas do reticulo de linina. Este ultimo é bem conservado e facilmente reconhecivel no interior da substancia acidophila (fig. 70).

Empregando a Oc. periplan. 25 × e a Obj. imm. 1/12, 100 × de Leitz e a luz branca da «Speziallampe» Nitra (6 volts, 6 amp.) de Leitz, tendo ainda o cuidado de manobrar o diaphragma-iris, não são reconhecidos como formando a inclusão, quer minusculas particulas acidophilas individualisadas, quer granulos, quer estructuras parecidas com ricketsias, mas apenas a nucleoproteina acidophila mencionada occupando as malhas de um reticulo de linina bem conservado (fig. 70).

Em um estadio mais adiantado, as nucleoproteinas acidophilas são mais abundantes, occupando, portanto o reticulo de linina em maior extensão e apresentando determinadas alterações (fig. 71).

Em lugar de tres ou quatro massas separadas, as nucleoproteinas acidophilas formam apenas duas massas irregulares distinctas (figs. 6,

de nucleoplasma claro (figuras em «borboleta») ou então uma unica massa de forma approximadamente semilunar (figs. 7, 14 e 71).

O reticulo de linina dentro da inclusão é algum tanto tumefacto e menos apparente do que em condições normaes, mostrando, comtudo, relativamente conservadas e ainda coradas particulas de basichromatina. A maioria dellas, porém, cora-se cada vez menos intensamente pelo hemalaum, apezar de que é sempre sensivel reconhecer algumas particulas mesmo em estadios adiantados da degeneração oxychromatica (figs. 15, 16, 22 e 72).

Estas particulas de forma irregular, mas de dimensões assaz uniformes, dão um aspecto granuloso ás inclusões (figs. 4, 5, 6, 16, 28 e 71); estes granulos, comtudo, são nitidamente basophilos e deixam-se, com facilidade, se identificar a particulas de basichromatina que fazem parte do reticulo de linina (fig. 71). Nas inclusões bem constituidas, o reticulo de linina e as particulas de basichromatina deixam-se melhor evidenciar em preparações coradas pela fuchsina basica e azul de Loeffler, pelo Bordeaux hemalaum ou pelo hemalaum simples.

Para conveniencia da descripção, devemos considerar, na inclusão typica e perfeitamente constituida, uma «substancia fundamental» e um «estroma».

A «substancia fundamental» corresponde ás nucleoproteinas acidophilas acima mencionadas; são estructuras, em parte, presentes no nucleo normal das cellulas hepaticas, taes a oxychromatina; em parte representam nucleo-proteinas que se originam no nucleoplasma a favor de condições anormaes. Formando a substancia fundamental não existem, de modo algum, particulas minusculas ou granulos acidophilos, mas apenas a substancia acidophila de extensão variavel occupando uma (fig. 70) ou mais malhas (fig. 71) do reticulo de linina. Em cortes examinados com o augmento de 600 a 800 diametros, esta substancia, quando o campo mimicroscopico é fortemente illuminado, contrasta com o arcabouço de linina em cujas malhas está situada e assim adquire contornos nitidos e um falso aspecto de granulos acidophilos (fig. 18).

O «estroma» corresponde ao arcabouço de linina o qual apresenta as seguintes alterações:

1º—tumefacção e deformação do reticulo de linina; 2º leve tumefacção e lyse da basichromatina ahi incrustada (fig. 72).

A «substancia fundamental» apresenta as seguintes caracteristicas, sendo claro que as reacções de coloração estabelecidas por Cowdry e Kitchen (1930) no quadro II para as inclusões, dizem respeito a essa substancia.

Na «Nuclealfärbung» segundo Feulgen, a «substancia fundamental» permanece sem coloração (fig. 49), de modo que não deve conter quantidade apreciavel de acido thymonucleino tal como a chromatina. Comtudo, esparsas no seu interior, apparecem diversos granulos levemente corados e algum tanto indistinctos, que correspondem, provavelmente, a particulas de basichromatina do «stroma» em via de soffrerem lyse.

Experimentados os «Farben-index» de Unna, a substancia fundamental apresenta as reacções de uma albumina cellular basica. Não se cora pelo azul de methyleno polychromico de Unna, nem pelo verde de methyla. O «Farbe-index» bordo e hemateina-alume indica que ella é uma albumina nuclear basica corada em carmim pelo bordo, ao passo que a mesoplastina se cora em azul (Unna, 1928, 18).

Em cortes desparafinados e tratados durante 24 horas por uma solução aquosa a 5 por cento de acido chlorhydrico, lavados em agua distillada durante horas e corados pelo bordo e hemalaum, as inclusões apparecem bem conservadas.

O mesmo resultado é conseguido quando usadas concentrações mais fortes de acido chlorhydrico, como sejam, soluções a 15, 20 e a 30 por cento. Apenas uma leve dissolução da mesoplastina (chromatina) é observada nessas condições, mas nunca uma dissolução completa e a evidenciação da «letzte Grundlage des Kernes» ou da «Zellenrumpf» tal como menciona e representa Unna (Unna, 1928, pg. 20).

Resultados semelhantes foram obtidos tratando os córtes desparafinados por uma solução aquosa a 1 por cento de carbonato de sodio.

As alterações nucleares que acabamos de descrever correspondem ás inclusões da febre amarella; conforme se viu, taes lesões occorrem apenas em pontos limitados do nucleoplasma.

A porção restante do nucleoplasma forma um espaço claro em torno da inclusão separando-a da membrana nuclear (figs. 7, 15, 22, 28 e 71). Neste halo caracteristico, é possivel, na maioria dos casos, manobrando o diaphragma iris e usando fortes augmentos e illuminação com a «Speziallampe» de Leitz, reconhecer porções bem coradas, embora escassas, do reticulo ainda inseridas, de um lado sobre a membrana nuclear, e de outro sobre a inclusão em continuidade directa com o seu «stroma» (figs. 67 e 71).

E' possivel que o reticulo de linina, soffrendo alterações regressivas ou seja uma necrose parcial, permaneça retrahida na parte central do nucleo, ahi constituindo a inclusão (fig. 72); esta inclusão é então, mantida em posição fixa e immovel, graças a remanescentes do reticulo de linina, ainda em parte, não alterados e que se inserem sobre a membrana

nuclear (figs. 7, 20, 51 e 67). Alguns detalhes referidos nas observações de Cowdry e Kitchen sobre inclusões na cellula viva, não discordam dessa supposição.

Outra alteração nuclear associada á presença das inclusões é o augmento de volume da basichromatina situada perto ou sobre a membrana nuclear.

Em macacos injectados com amostra virulenta de virus de febre amarella, esta lesão era muito evidente (figs. 31, 32, 33 e 34), ao passo que era menos accentuada em exemplares injectados com amostras de fraca virulencia (figs. 23, 24 e 25), sendo discreta nos casos humanos (figs. 62, 63, 64, 65 e 68).

Até agora, essa alteração nuclear tem sido referida nas doenças de virus como representado uma deposição marginal da chromatina nuclear ou como um augmento da chromatina situada na membrana nuclear em consequencia da opposição de nova chromatina.

E' possivel que essa explicação seja verdadeira no que respeita a outras inclusões nucleares que não tivemos opportunidade de estudar, como as do herpes, virus III do coelho, varicella, etc.

No que respeita á inclusões da febre amarella, essa hypothese parece-nos pouco acceitavel, visto como sempre pudemos verificar particulas de basichromatina ainda reconheciveis no stroma das inclusões, mesmo em phases avançadas da degeneração oxychromatica, quando já era muito accentuada a chamada «marginação» da chromatina sobre a membrana. Por outro lado repugna-nos admittir que taes particulas de basichromatina, depois de soffrerem alterações necroticas mais ou menos accentuadas (lyse) e portanto terem apresentado modificações chimicas de maior ou menor importancia, sejam ainda capazes de se fusionar e constituir uma mesma substancia chimica com a basichromatina da membrana nuclear, a qual nas primeiras phases da degeneração oxychromatica é geralmente conservada e bem corada.

Comprehendemos melhor as figuras 30, 31, 32, 33, 34 e 72 quando admittimos que ellas representam, simplesmente, uma *tumefacção local* da basichromatina que, em condições normaes, se encontra localisada sobre ou perto da membrana nuclear.

Nos estadios iniciaes (figs. 20 e 70), essa tumefacção não é ainda bem apreciavel, sendo que, nesses estadios, as alterações regressivas interessam apenas, uma porção circumscripta do nucleoplasma. Mais tarde, contudo, ella se torna cada vez mais accentuada (figs. 23, 24 e 25) ao passo que as alterações cellulares regressivas ganham progressivamente outros componentes nucleares e, mais tarde, o cytoplasma.

Tal alteração nuclear não constitue facto excepcional em cytologia, tendo sido uma tumefacção local da chromatina sobre a membrana nuclear desde a longa data assignalada por Pianese (1896) em cellulas de tumores.

Os nucleos augmentam de volume não só nas primeiras phases (fig. 70), como mais tarde, quando encerram inclusões bem desenvolvidas. Assim, na fig. 23, elle mede 12 por 8,5, ao passo que na fig. 12, o nucleo normal de uma cellula hepatica mede 6,5 de diametro. Em virtude desse augmento, os nucleos se alongam (figs. 21 e 23), alguns se tornam enrugados «as if the nuclei had lost water» (Cowdry and Kitchen).

Não conseguimos um material favoravel ao estudo dos estadios terminaes da degeneração oxychromatica. Mesmo nos preparados de figado nos quaes mais de 90 por cento das cellulas hepaticas continham inclusões, os estadios terminaes mostram-se surprehendentemente escassos. Consideramos estadios terminaes, não os representados nas figs. 25 e 72, mas aquelles em que toda a membrana nuclear é desapparecida.

Em algumas circumstancias raras, verificamos cellulas hepaticas com a membrana nuclear mais ou menos conservada, ao passo que o seu conteúdo acidophilo não era mais visivel (fig. 38). Não é facil interpretar taes aspectos; é possivel que elles resultem de um artificio de technica. De outro lado elles recordam os «empty nuclei» encontrados no homem (fig. 60).

Pesquizamos as inclusões, juntamente com Penna de Azevedo, nas capsulas suprarenaes, tendo ahi encontrado alterações do conteúdo acidophilo do nucleoplasma em cellulas da camada cortical, assaz suggestivas de inclusões. Consideramos, comtudo, esses aspectos representados nas figs. 37 e 40 como não concludentes.

Constituindo, de accôrdo com as autoridades, causa de erro em pathologia intracellular, a confusão entre alterações nucleolares e inclusões intranucleares especificas, e um dos enganos que tem concorrido para desacreditar o valor das alterações cytologicas verdadeiramente especificas nas doenças causadas por virus filtraveis, foi nosso cuidado primordial verificar qual o modo de se comportar do nucleolo nas cellulas hepaticas do *Macacus rhesus* em que descreviamos corpusculos intranucleares especificos da febre amarella.

Esse estudo não offerece difficuldade em virtude da abundancia com que são encontrados os corpusculos especificos, não sendo raro observar cortes de figado nos quaes a quasi totalidade das cellulas hepaticas os apresenta. Tambem, no macaco, as alterações nucleares não são tão proemi-

nentes como no homem (figs. 5, 6, 7, 14, 15, 16 e 19), sendo que o nucleolo apparece nitidamente distincto quer topographicamente, quer pelas reacções de coloração das inclusões, mesmo em estadios adiantados da degeneração oxychromatica.

A distincção entre nucleolos e corpusculos especificos apparece, porém, com grande evidencia nos preparados corados pelo methodo de Goodpasture para corpusculos de Negri (Goodpasture, 1925).

1—Os córtes desparafinados são corados, durante 10 minutos em uma solução a 0,5 % de fibrina basica em alcool a 20 %, a qual, na occasião de usar se deve juntar 1 % de oleo de anilina.

2—Lavar rapidamente em agua corrente, enxugar com papel de filtro e differenciar em alcool a 95°.

3—Lavar e corar durante alguns segundos pelo azul de methyleno de Loeffler preparado recentemente.

4—Lavar. Deshydratar no alcool absoluto. Xylol. Oleo de cedro. Balsamo.

O methodo dá melhores resultados em material fixado no liquido de Zenker. Em material fixado no formol a 10 % obtem-se uma coloração diffusa e intensa dos tecidos pela fuchsina; esta exige uma differenciação prolongada pelo alcool a qual as mais das vezes acarreta o descoramento do proprio nucleolo. Em taes condições, obtivemos bom resultado fazendo uma differenciação muito rapida em alcool a 90° addicionado de 10 gottas de acido acetico para cada 60 c.c. (Goodpasture-acetico).

Quando os corantes são recentes e a differenciação foi conduzida de modo conveniente, a unica estructura que apparece corada pela fuchsina nas cellulas hepaticas normaes do *M. rhesus,* é o nucleolo; a sua coloração, em vermelho vivo, contrasta fortemente com a da chromatina, em violeta, e a da membrana nuclear, em azul.

Nas cellulas hepaticas de macacos infectados pelo virus da febre amarella, os corpusculos especificos tingem-se em tonalidades intermediarias entre o azul e o violeta, contrastando de modo accentuado nas mesmas cellulas com o nucleolo tinto em vermelho (figs. 4, 5, 6, 7 e 67).

Pelo seguinte processo obtem-se um contraste nitido de coloração entre nucleolo e corpusculo intranuclear especifico; o primeiro, revelando os detalhes de estructura de um amphinucleolo, conforme verificaram Cowdry e Kitchen, se apresenta em azul escuro e em azul da Prussia; o segundo se cora em rosa (substancia fundamental) com granulações violeta claro (caryosomos do «stroma»).

1—Fixar no Zenker-acido acetico ou no Helly e incluir em para-

fina. Cortes de 4—6 de espessura, desparafinados, passados em alcool a 70° iodado, descorados no alcool a 70°, levados á agua.

2—Corar durante 10 minutos em uma solução aquosa a 1 por cento de phloxina.

3—Lavar e corar durante 10 minutos em uma solução aquosa a 1 por cento de azul de toluidina (de preferencia, antiga).

4—Enxugar o excesso da agua e differenciar por agitação continua no alcool a 90° contido em um tubo de Borrel até que reappareça inteiramente a coloração rosea dos tecidos.

5—Alcool absoluto. Xylol. Oleo de cedro. Balsamo. Laminula.

Em cortes corados pela phloxina azul de toluidina, o nucleo da cellula hepatica normal de *M. rhesus* apresenta geralmente um nucleolo unico tinto em azul quasi negro, com contornos mais escuros; prolongando-se mais a differenciação, nota-se no nucleolo a estructura referida anteriormente na descripção do nucleo normal. A basichromatina e a membrana nuclear revestem tonalidades diversas do azul e violeta.

Na cellula hepatica de *rhesus* inoculado com virus da febre amarella na qual sobrevem os corpusculos nucleares especificos, as alterações nucleolares podem ser, assim, summariadas:

a) *tumefacção e separação dos componentes nucleolares*:

O nucleolo augmentado de volume mostra separação de seus componentes normaes que formam duas porções juxta-postas; uma dellas é menor, sendo formada pelos componentes chromophilos do nucleolo fortemente corados em azul escuro. A «porção restante» do nucleolo, de maiores dimensões, piriforme ou de fórma irregular e ás vezes de contornos denteados, cora-se fraca e diffusamente em uma bella tonalidade azul da Prussia (figs. 50 e 51). Em outros nucleos nota-se apenas tumefacção do nucleolo em cujas bordas, ás vezes em dois ou tres pontos distinctos, apparecem os componentes chromophilos em azul quasi negro (figs. 70 e 71).

b) *marginação de componentes nucleolares*:

Os dois componentes nucleolares gradualmente se separam (fig. 51) dirigindo-se a porção mais intensamente chromophila para a membrana sobre a qual vêm se incrustar distinguindo-se então apenas pelas suas maiores dimensões de granulos de chromatina que ahi tambem se encontram. A porção restante do nucleolo, em azul da Prussia, permanece na séde habitual do nucleolo.

Os mesmos aspectos podem ser verificados usando outros methodos de coloração. O methodo pelo carbol-methyl-grün-pyronin de Pappenheim-Unna tem a vantagem de mostrar que a porção componente nucleolar que designamos por componente chromophilo não parece ser constituido por basichromatina; com effeito, elle se cora em vermelho pelo methodo de Pappenheim-Unna, ao passo que a basichromatina se tinge em verde.

MORPHOLOGIA DOS CORPUSCULOS INTRANUCLEARES NO HOMEM

O criterio que adoptamos para a caracterisação dos corpusculos intranucleares no homem foi o seguinte: reconhecer como «corpusculos intranucleares especificos da febre amarella» unicamente as figuras typicas (figs. 62, 65 e 68) nas quaes «o reticulo de linina alterado é englobado por uma substancia acidophila mais ou menos abundante que se collecciona na porção central do nucleo; taes porções alteradas do nucleo são de todos os lados separadas da membrana nuclear por um halo claro; acompanhando taes aspectos typicos nota-se, sobre a membrana nuclear, nitida tumefacção da basichromatina ahi localisada.

Correspondem esses aspectos aos estadios typicos que descrevemos no macaco como «figuras em calota de esphera» e «em borboleta» (figs. 18 e 15).

Não levamos em conta, no material humano, estadios mais precoces da formação dos corpusculos intranucleares, por duas razões. A primeira foi a facilidade de confundir com esses estadios precoces, outras lesões nucleares não especificas, taes modificações da oxychromatina e de outras nucleoproteinas associadas a alterações degenerativas da cellula hepatica, bem como alterações do nucleolo.

A segunda foi que, em todos os *M. rhesus* inoculados com virus da febre amarella não encontramos um só no qual existissem apenas aquellas phases precoces com exclusão das phases typicas («figura de borboletas» «calota de esphera»).

Nas figuras 61, 62, 63, 64, 65, 68 e 69 indicamos o aspecto dos corpusculos intranucleares nos tres casos humanos de febre amarella em que os observamos. Um delles (Caso 5271) é uma menina de 4 annos de edade, removida de um fóco de febre amarella para o Hospital Oswaldo Cruz e que ahi veio a fallecer cerca de 40 horas após o inicio da molestia, segundo informações do seu medico assistente, o Dr. Evandro Chagas.

A autopsia foi iniciada 30 minutos após o obito.

Este foi o caso humano em que mais abundantes se mostraram os corpusculos intranucleares (figs. 63, 64 e 65). Podem ser encontrados em quasi todos os cortes de figado examinados, mas são antes escassos e de

modo algum comparaveis em abundancia á dos corpusculos intranucleares em cortes de figado de macacos infectados.

Uma particularidade que notamos varias vezes foi a de que, quando, depois de pesquiza, por vezes demorada, vem a se encontrar uma cellula hepatica com corpusculos intranucleares, nos campos visinhos, mas não nas cellulas immediatamente adjacentes, sempre é possivel encontrar diversas outras cellulas com corpusculos intranucleares. Ha, assim, em cada corte, um foco ou uma pequena area onde estão acantonadas as cellulas com corpusculos intranucleares.

O segundo caso (Caso 2485) em que encontramos corpusculos intranucleares na cellula hepatica (figs. 61 e 62) foi um dos primeiros casos da epidemia de 1928. Trata-se de um soldado no qual a doença evoluio, bastante rapidamente, em pouco mais de 48 horas, segundo informações fornecidas ao Dr. Caleb Bomfim que foi quem trouxe o material ao nosso laboratorio.

Ahi, tambem, as cellulas com corpusculos intranucleares podem ser encontradas em quasi todos os córtes, mas sempre esparsas e incomparavelmente mais raras que no macaco.

Alguns desses corpusculos dão a impressão de serem incompletamente desenvolvidos. Elles apresentam os caracteres geraes das alterações especificas: substancia acidophila na parte central do nucleo, independente do nucleolo e tumefacção da basichromatina na membrana. O seu stroma, porém, é mais facilmente identificavel ao reticula de linina do que nos corpusculos completamente desenvolvidos, onde tal reticulo soffre alterações mais ou menos accentuadas. Tambem o nucleoplasma, em torno da substancia acidophila conserva estructura proxima do normal (fig. 62) ao em vez de se apresentar como um halo apparentemente sem estructura (Oc. 4×) como nos corpusculos bem desenvolvidos.

O terceiro caso (Caso 5396), (figs. 68 e 69) no qual encontramos corpusculos intranucleares especificos, era um rapaz de 19 annos, fallecido no 6º dia de molestia e cuja autopsia iniciamos 23 minutos após o obito.

Embora o aspecto não seja tão semelhante ao dos corpusculos intranucleares do macaco como os que vimos nos outros dois casos, offereceu as mesmas caracteristicas geraes de taes corpusculos (fig. 68).

A pesquiza de inclusões typicas resultou negativa em 14 outros casos de febre amarella (quadro (VIII). Não consideramos, porém, esse resultado ainda como definitivo. Com effeito, no Caso 5396, onde mais tarde viemos a encontrar corpusculos intranucleares, pesquizas anteriores haviam sido infructiferas. E' possivel, assim, que em outros, tambem, elles

existam de modo muito escasso e venham a ser posteriormente encontrados por um acaso feliz.

Devemos informar que, de facto, em alguns dos 14 casos reunidos no quadro VIII, embora não existissem inclusões typicas, notamos muitas vezes augmento apreciavel de particulas acidophilas intranucleares (fig. 59), em relação aos casos humanos que examinamos como contraprova. Em taes casos nos sentimos embaraçados para negar que taes aspectos não tivessem relação com a degeneração oxychromatica. Achamos que é indispensavel um melhor conhecimento das phases iniciaes da degeneração oxychromatica antes de tirar qualquer conclusão em casos humanos de febre amarella com modificações accentuadas das nucleoproteinas acidophilas.

O que não resta duvida é que a amostra ou amostras de virus da febre amarella que occorreram durante a epidemia de 1928 no Rio de Janeiro, eram fracas productoras de inclusões no homem, ao passo que no macaco foram capazes de determinar abundante producção de inclusões quando directamente inoculados com o sangue do doente no macaco (quadro I).

Certamente isso não vem em apoio da ideia segundo a qual as condições do virus são fundamentalmente identicas no homem e no macaco, questão essa sobre a qual voltaremos em outro logar.

E' importante para o assumpto de que trata este capitulo, que sejam perfeitamente distinguidas entre si as alterações intranucleares especificas e não especificas. Por outras palavras, é indispensavel estabelecer quaes as alterações intranucleares que estão associadas a processos regressivos communs e que podem simular, mais de perto, as verdadeiras inclusões intranucleares.

Com esse fim, procuramos distinguir provisoriamente, dando-lhes uma designação arbitraria, todas as alterações que, a nosso juizo, eram sufficientemente typicas e pareciam occorrer em circumstancias variadas com aspecto mais ou menos constante.

Inclusões intranucleares: As inclusões intranucleares typicas nos casos humanos estão localisadas á porção central do nucleo, sendo separadas da membrana nuclear por um espaço claro de nucleoplasma. A tumefacção da basichromatina sobre a membrana nuclear nunca é tão accentuada no homem (figs. 65 e 1) como nos macacos, especialmente os injectados com a amostra africana Asibi (fig. 31 e 34).

No nosso material, quer do homem, quer do macaco, as inclusões não são formadas «within the nucleus in colony-like masses of which the individual particles are about the size of most ricketsiae», conforme descrevem Cowdry e Kitchen no seu material.

No nosso material, as inclusões da febre amarella são formadas por uma «substancia fundamental» e por um «stroma» (figs. 71 e 69).

A substancia fundamental é uma nova substancia que se origina em virtude de processos anormaes decorrendo no nucleo. Ella é, provavelmente, formada por diversas nucleoproteinas acidophilas relacionadas em parte com a oxychromatina, mas em parte provavelmente com outras nucleoproteinas derivadas do nucleoplasma.

Em phases iniciaes as nucleoproteinas acidophilas acima mencionadas ficam localisadas apenas em algumas malhas do reticulo de linina. Examinadas então com o augmento de 600—1000 diametros em um campo microscopico fortemente illuminado, as substancias acidophilas tornam-se mais conspicuas do que o reticulo e assumem o falso aspecto de granulos (fig. 68). O exame com augmento mais forte usando a luz branca da «Speziallampe» Nitra de Leitz, e varias aberturas do diaphragma-iris, permitte observar dentro da inclusão um stroma que corresponde ao reticulo de linina do nucleoplasma alterado (fig. 69).

Nas condições opticas mencionadas, o «stroma» se mostra formado por um reticulo e por particulas basophilas ou granulos incrustados no reticulo.

Esses granulos de forma irregular e de dimensões sensivelmente uniformes correspondem a particulas de basichromatina levemente tumefactas, as quaes soffrem lyse e por conseguinte, são fracamente coradas pelo hemalun (fig. 69).

Os amphinucleolos são, em regra geral, facilmente differenciaveis, quer topographicamente, quer pelas reacções de coloração das inclusões, conforme haviamos notado nos macacos (Torres, 1928 *c*, 1928 *j*). Em alguns casos existe um duplo nucleolo, mas ordinariamente, conforme notaram Cowdry e Kitchen, o nucleolo é relativamente bem conservado, ao passo que, no mesmo preparado, as alterações nucleolares são bastante pronunciadas em cellulas hepaticas que não apresentam inclusões.

Granulos erythrocytiformes: No nucleoplasma de uma cellula hepatica apparecem um ou dois granulos acidophilos, redondos, de contornos nitidos e intensamente corados pela eosina (figs. 57, 58 e 60). O reticulo de linina e a membrana nuclear, em taes cellulas, geralmente não mostram modificações do aspecto normal.

Algumas vezes a porção central do granulo acidophilo é mais pallidamente corada, contrastando com a peripheria: a apparencia de erythrocyto é, então, bem apreciavel (figs. 57 e 58).

Muitas vezes esses granulos peculiares existem dentro de «empty nuclei» junto da membrana nuclear e de remanescentes do reticulo de

linina (fig. 60), isso quer em casos de febre amarella, quer em outras doenças.

A forma redonda regular e os contornos nitidos que elles offerecem quando examinados com Obj. imm. 1/12 e Oc. periplan. 4× ou 8× de Leitz, tornam-se menos nitidos quando se os examina com a Oc. 12 ou 25 de Leitz e a luz da «Speziallampe» de Leitz. Em taes condições se verifica que o granulo erythrocytiforme é formado por uma substancia acidophila (oxychromatina ?) depositada em duas ou tres malhas do reticulo de linina. O forte contraste existente entre essas substancias intensamente coradas em roseo e as malhas do reticulo de linina explica o aspecto que comparamos ao de um erythrocyto que possue o granulo quando examinado com 800 a 1000 diametros em um campo microscopico fortemente illuminado.

Nunca se verifica tumefacção da basichromatina sobre a membrana nuclear neste typo de alteração nuclear, conforme acontece com as inclusões das doenças de virus (figs. 57, 58 e 60).

Particulas acidophilas: Numerosas particulas acidophilas, pequenas, irregulares, algumas vezes formando grupos distinctos (figs. 59 e 56) são algumas vezes encontradas no interior de nucleos de cellulas hepaticas, quer em casos de febre amarella (fig. 59), quer em outras doenças (fig. 56).

A distincção é, algumas vezes, delicada entre estas particulas acidophilas e os granulos erythrocytiformes. Quasi sempre, porém, as particulas acidophilas (oxychromatica ?) acompanham em certa extensão as malhas do reticulo de linina, apresentando assim, um contorno irregular e franjado. Tambem os seus contornos tornam-se muito pouco nitidos quando usados augmentos mais poderosos e manobrado o diaphragma-iris.

Basophilia do nucleoplasma: Não é raro observar em nucleos enrugados de cellulas hepaticas, quer na febre amarella, quer em outras doenças (fig. 55), uma coloração azul do nucleoplasma, algumas vezes apenas na visinhança dos nucleolos.

E' uma condição nuclear mais ou menos semelhante a que assignalamos anteriormente nas cellulas hepaticas, de *rhesus* inoculados ou não inoculados (Torres, 1929 a, figs. 44 e 45).

Algumas vezes existe uma lyse apparente da basichromatina intranuclear em taes nucleos azues.

Multiplicidade do nucleolo: Na febre amarella, constitue uma alteração proeminente, a occurrencia de muitos nucleolos dentro de um mesmo nucleo (figs. 59 e 54). Taes nucleolos offerecem, de regra, grande variabilidade de dimensões, não sendo raro encontrar micronucleolos cujas

dimensões representam um quinto ou menos da de outros nucleolos no mesmo nucleo (figs. 59 e 54). Todos esses nucleolos mostram uma estructura typica de micronucleolos em preparados corados pela phloxina e azul de toluidina.

No nucleo interkinetico da cellula hepatica occorre, assim, uma reproducção ou multiplicação do nucleolo muito accentuada na febre amarella, mas occorrendo tambem em outras molestias (Quadros VIII e IX).

Em alguns casos, um micronucleolo fica de permeio com particulas acidophilas, de modo que, quando o campo microscopico é fortemente illuminado, elle parece corado, tambem, em roseo, o que se verifica não ser o caso quando se fecha o diaphragma e o campo é obscurecido. Isso verificamos na cellula desenhada na figura 59. Figuras intranucleares complexas podem, assim, difficultar o reconhecimento da degeneração oxychromatica na cellula hepatica, em casos humanos de febre amarella, quando os seus aspectos não são typicos.

Nucleos esvasiados: A figura 60 mostra nucleos esvasiados encontrados em caso humano de febre amarella. Elles são semelhantes ás estructuras descriptas como «empty nuclei» e representadas na figura 48 do trabalho de Cowdry e Kitchen (1930).

Tumefacção dos nucleolos: Foi encontrada quer na febre amarella, quer em outras doenças (Quadros VIII e IX). A's vezes, o nucleolo apresenta uma estreita margem acidophila e o centro basophilo (fig. 53).

VIRUS DA FEBRE AMARELLA E INCLUSÕES INTRANUCLEARES

Sendo o agente etiologico da febre amarella um virus filtravel e ultramicroscopico, é impossivel affirmar ou negar, em uma base morphologica, se elle toma parte na formação dos corpusculos nucleares especificos e está nelles incluido. Isso, aliás, não foi nem poderá ser feito para nenhum dos corpusculos cuja especificidade é geralmente admittida, taes os de Negri, de Guarnieri e de Bollinger.

Com effeito, usando o microscopico actual, uma particula com as dimensões de 0.2 está nos limites da visão clara, «for resolution depends on 1/2 n. a. which, using white light and the best lenses, is about 0.2». (Martin). Os limites physico e optico previstos pela theoria estão quasi attingidos (Bernard). No emtanto, experiencias de filtração atravéz de membranas de collodion levam á supposição de que o diametro das particulas dos virus filtraveis seja approximadamente a da molecula da proteina (2-3 $\mu\mu$); contudo outras indicam uma magnitude egual ou maior que as particulas do «collargol», ou seja 20 $\mu\mu$ (Martin).

Por conseguinte, o problema das relações entre virus filtraveis e as

inclusões cellulares especificas que os caracterisam só poderá ser abordado de modo indirecto e é isso o que procuraremos fazer accumulando dados que a elle digam respeito.

Estão neste caso os que estabelecem uma relação entre a presença do virus da febre amarella no sangue e nos tecidos demonstrada por inoculação em animaes sensiveis e pelas lesões typicas da febre amarella experimental e a existencia dos corpusculos nucleares especificos na cellula hepatica.

Os quadros annexos informam do que apuramos no material do Instituto Oswaldo Cruz de que pudemos dispor.

Conforme mostram os quadros, o resultado da inoculação em animal sensivel só é indicado em certo numero delles, ou porque para a conclusão das experiencias em que serviram os animaes fosse bastante a verificação anatomo-pathologica da febre amarella experimental ou porque não tenhamos colhido as necessarias informações junto aos collegas já mencionados os quaes bondosamente nos forneceram o material. A infecção do macaco, nos casos em que não foi feita inoculação a outro macaco, é garantida pela occurrencia de lesões typicas de febre amarella experimental, especialmente as do figado.

O que chama, em primeiro logar, a attenção, é a frequencia com que os corpusculos especificos apparecem nos macacos inoculados.

Assim, elles são encontrados, sem excepção, em 6 animaes inoculados com sangue retirado no decurso das primeiras 72 horas de molestia, de doentes de febre amarella da epidemia no Rio de Janeiro, em 1928 (v. Quadro I).

Elles apparecem em tres, dentre quatro macacos que foram picados por *Aedes aegypti* quer infectados em doente de febre amarella, quer em *M. rhesus* inoculados com amostras ou africana «Asibi» (v. Quadro II). O macaco em cujas cellulas hepaticas não ha inclusões, não se infectara, conforme mostraram o exame histologico e a inoculação em outro macaco.

Ao passo que os corpusculos nucleares especificos são presentes em todos os 12 animaes (v. Quadro IV) inoculados com sangue de macacos infectados pela amostra africana «Asibi», existem, apenas, em 4, dentre 8 inoculados com sangue de macacos infectados pelas amostras brasileiras (v. Quadro III). Tambem dentre 14 macacos (v. Quadro V) inoculados com emulsão de figado virulento (amostra brasileira), elles existem em 7, ao passo que são encontrados em todos os dez animaes (v. Quadro VI) inoculados com emulsão de figado virulento (amostra africana «Asibi»). Esses factos estão de accordo com as differenças de virulencia e irregula-

ridade de acção notadas nas amostras americanas (Aragão, Cunha e Muniz, Davis, Monteiro) quando comparadas com a amostra africana «Asibi».

Dentre 15 animaes inoculados com emulsão e excreta de *Aedes aegypti* infectados, os corpusculos nucleares especificos existiam em 12 (v. Quadro VII).

Sendo os corpusculos nucleares especificos possivelmente associados á presença do virus no interior das cellulas affectadas, offerece interesse verificar que relações apresentam elles com a evolução da molestia experimental.

O exame dos quadros annexos mostra que os corpusculos nucleares especificos não foram encontrados em um animal inoculado com sangue virulento (amostra brasileira) de outro macaco e morto no 3º dia (v. Quadro III), nem em outro inoculado com emulsão de mosquitos infectados (amostra brasileira F. W.) e morto no 3º dia (v. Quadro VII). Ao contrario, elles eram presentes e mesmo abundantes, em 3 macacos (v. Quadro VI) inoculados com emulsão de figado virulento (amostra africana «Asibi»).

Em macacos inoculados com amostra brasileira, os corpusculos nucleares especificos são abundantes em um animal infectado com sangue de doente e morto no 5º dia (v. Quadro I), existindo, mas não em abundancia, em outro animal picado por mosquitos e morto no 5º dia (v. Quadro II).

Assim, de inicio, é patente que a virulencia da amostra de virus da febre amarella empregada tem influencia manifesta, sendo os corpusculos especificos encontrados em animaes mortos no 3º dia de inoculação quando inoculados com a amostra africana «Asibi», ao passo que só começam a apparecer no 5º dia de inoculação nos animaes inoculados com amostras brasileiras.

Os corpusculos especificos mostram-se geralmente presentes e algumas vezes abundantes, em *M. rhesus* infectados com amostras brasileiras e examinados entre o 6º e o 14º dias de molestia.

O exame do Quadro V suggere uma desapparição gradual dos corpusculos em animaes que sobrevivem á infecção. Esta interpretação encontra, porém, sem duvida, uma objecção na irregularidade de acção atraz mencionada das amostras brasileiras; é que tal irregularidade poderá explicar, ella propria, os resultados colligidos no quadro acima mencionado.

O Quadro VII mostra que nos macacos inoculados com mosquitos infectados, especialmente com a amostra africana «Asibi» não são raros os casos de infecção prolongada, nos quaes os corpusculos nucleares es-

pecificos occorrem em animaes examinados depois de 14, 17 e 21 dias de infecção. Tambem no Quadro V existe um macaco com molestia prolongada e corpusculos nucleares especificos no 36º dia de molestia, nos Quadros I e III, 2 macacos com corpusculos especificos no 15º dia, no Quadro IV um no 25º dia de molestia.

E' possivel que as inclusões na febre amarella estejam associadas á presença *in loco* de micro-organismos ultramicroscopicos. Mas ellas podem representar, sem duvida, unicamente a acção nociva occorrida pelo virus sobre a cellula hepatica. As inclusões seriam, assim, a consequencia tardia da acção nociva occasionada pelo virus. Sendo assim, ellas poderão existir na cellula, embora o virus não mais ahi se encontre, nem no sangue.

De qualquer maneira, a explicação mais simples, a nosso juizo, para a escassez das inclusões no homem e a sua abundancia no macaco está nas differenças que a distribuição do virus apresenta nas duas especies animaes.

E' claro que, se as inclusões constituem uma alteração especifica nas cellulas hepaitcas associada á infecção pelo virus da febre amarella, esteja presente em quantidade sufficiente e exerça a sua acção durante um periodo de tempo sufficiente.

E' logico que quanto maior for a quantidade de virus e maior o prazo de tempo durante o qual elle exerce a sua acção nociva, tanto mais intenso será o seu effeito nocivo.

Serão absolutamente identicas as condições relativas á presença do virus da febre amarella no macaco e no homem ?

Seguramente não: a infecciosidade do sangue e dos tecidos diminue e mesmo, de regra, desapparece, inteiramente, no doente de febre amarella após o terceiro dia de molestia: menos virus no sangue e nos tecidos, menor numero de inclusões nas cellulas do figado.

No macaco, ao contrario, as experiencias de transmissão da molestia são relativamente faceis de se conseguir em prazo de tempo distinctamente maior que no homem: maior quantidade de virus no sangue e nos tecidos ou então virus agindo durante maior prazo de tempo, mais numerosas as inclusões nas cellulas do figado.

O resultado do estudo do material humano que examinamos concorda com os de Cowdry e Kitchen, sendo desfavoraveis á hypothese segundo a qual as inclusões significariam a presença actual do virus da febre amarella na cellula hepatica.

Na verdade encontramos as inclusões, embora escassas, em um doente que morreu no sexto dia de molestia (Quadro VIII).

QUADRO 1

Macacos inoculados com sangue de doentes de febre amarella [1] *retirado durante as primeiras 72 horas.*

N. do animal injectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensivel (*M. rhesus*)	Inclusões intranucleares typicos na cellula hepatica	Observações
M. rhesus 8 Ar. [2]	5 dias		Presentes; abundantes	O animal teve morte espontanea. O doente era um caso benigno. A autopsia mostrou lesões typicas de febre amarella nos cortes histologicos de figado.
M. cynomolgus 7 Ar.	7 dias		Presentes	O animal teve morte espontanea. Os cortes histologicos de figado mostram lesões typicas de febre amarella.
M. rhesus 478 Ar.	8 dias	Positivo	Presentes	Inoculação com 8 cc. de sangue de um caso suspeito, o animal teve morte espontanea. Lesões histologicas typicas de febre amarella no figado.
M. rhesus 37 Ar.	9 dias		Presentes; não abundantes	O animal teve morte espontanea. O doente era um caso grave. Lesões histologicas de febre amarella no figado e rins.
M. rhesus 6 C. Mn. [3]	11 dias	Positivo	Presentes	O animal teve morte espontanea. O doente era um caso benigno. A amostra isolada ficou sendo a F. W.
M. rhesus 9 Art.	15 dias		Presentes; raras	Inoculado com sangue de dois casos benignos.

[1] — Epidemia de 1928, no Rio de Janeiro, Brasil.
[2] — Material devido á gentileza do Dr. H. de Beaurepaire Aragão.
[3] — Material devido á gentileza dos Drs. A. Marques da Cunha e J. Muniz.

QUADRO II

Macacus rhesus picados por Aedes aegypti infectados

N. do animal infectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensivel (*M. rhesus*)	Inclusões intranucleares typicos na cellula hepatica	Observações
M. rhesus 35 Ar.	5 dias		Presentes	O animal teve morte espontanea. Os mosquitos foram infectados em um doente de febre amarella. A autopsia mostra lesões histologicas de febre amarella.
M. rhesus 226 Ar.	6 dias		Presentes	Sacrificado em agonia. A autopsia mostra lesões histologicas typicas de febre amarella no figado e rins.
M. rhesns 32 C. Mn.	8 dias	Negativo	Ausentes	Foi picado por 2 *Aedes aegypti* que sugaram o *rhesus* 25 (virus brasileiro F. W.), os quaes apparentemente não se infectaram. Os cortes de figado do 32 C. M. não mostram as lesões de febre amarella experimental.
M. rhesus 400 Ar.	8 dias		Presentes	Sacrificado. Os mosquitos estavam infectados com virus africano *Asibi*. A autopsia mostra lesões typicas de febre amarella no figado.

QUADRO III

Animaes inoculados com sangue virulento (virus brasileiro) de outros macacos

N. do animal injectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensivel (*M. rhesus*)	Inclusões intranucleares typicos na cellula hepatica	Observações
M. rhesus 28 Ar.	3 dias		Ausentes	Morto precocemente de peritonite. Os cortes histologicos de figado não mostram as lesões de febre amarella.
M. rhesus 98 Ar.	6 dias	Negativo	Ausentes	Apresentou febre nos primeiros dias. Parecendo que ia sobreviver, foi sacrificado. A autopsia mostrou bronchopneumonia do pulmão direito, petechias na pleura, degenerescencia gordurosa do figado, pleurite fibrosa chronica direita. Lesões de febre amarella experimental ausentes.
M. rhesus 16 C. Mn.	6 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Amostra F. W. de virus. Sacrificado após queda de temperatura. Os cortes de figado mostram lesões de febre amarella experimental.
M. rhesus 100 Ar.	10 dias	Negativo	Presentes	Inoculado com soro de *rhesus* infectado conservado na geladeira de um dia para outro. Apresentou curva thermica irregular sendo sacrificado.
M. rhesus 76 Ar.	10 dias	Negativo	Presentes; abundantes	Inoculado com 0 cc. 2 de soro de *M. cynomolgus* infectado. Sacrificado.
M. rhesus 78 Ar.	10 dias		Presentes; discretas	Inoculado com sangue de *M. cynomolgus* 56 Ar. infectado. Sacrificado. Os cortes de figado mostram lesões typicas de febre amarella experimental.

M. rhesus 74 Ar.	12 dias		Ausentes	Inoculado com 1 cc. de sangue do *rhesus* 55 Ar., que fora injectado com virus, mas que sobreviveu, tendo apresentado oscillações de temporatura. O 74 Ar. apresentou, tambem, oscillações de temperatura, sendo sacrificado. A autopsia mostrou tuberculose chronica dos pulmões, figado e baço. Os cortes de figado não mostram as lesões da febre amarella experimental.
M. cynomolgus 15 C. Mn.	15 dias		Presentes; não abundantes	Amostra F. W. de virus. Morte expontanea. Os cortes de figado mostram lesões de febre amarella experimental.

QUADRO IV

Animaes inoculados com sangue virulento (virus africano, Asibi) de outros macacos

N. do animal infectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensivel (*M. rhesus*)	Inclusões intranucleares typicos na cellula hepatica	Observações
M. rhesus 457 Ar. Cl. 1	5 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de tres mosquitos suppostos infectados. Reinoculado com sangue virulento a 24/VI. Sacrificado a 29/VI. Os cortes de figado mostram lesões de febre amarella experimental.
M. rhesus 445 Ar.	5 dias		Presentes; não abundantes	Inoculado com sangue do *rhesus* 428. Morte expontanea.
M. rhesus 485 Ar. Cl.	5 dias		Presentes	Inoculado com 2 cc. de sangue do *rhesus* 478. Os cortes de figado mostram lesões de febre amarella experimental.
M. rhesus 489 Ar. Cl.	5 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com 1 cc. de sangue do *rhesus* 479. Sacrificado. Os cortes de figado mostram lesões typicas de febre amarella experimental.
M. rhesus 443 Ar.	6 dias		Presentes	Inoculado com sangue do *rhesus* 427. Sacrificado. Os cortes de figado mostram lesões typicas de febre amarella experimental.
M. rhesus 476 Ar. Cl.	6 dias	Positivo	Presentes	Sacrificado. Os cortes de figado mostram lesões typicas de febre amarella experimental.
M. rhesus 480 Ar. Cl.	6 dias		Presentes	Inoculado com sangue do *rhesus* 476. Os cortes de figado mostram lesões typicas de febre amarella experimental.

M. rhesus 198 Ar.	7 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Inoculado com 10 cc. de sangue secco e reservado no vacuo, vindo de Nova York, America do Norte. Sacrificado. A autopsia mostra lesões microscopicas typicas de febre amarella no figado e rins.
M. rhesus 444 Ar.	8 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com sangue do *rhesus* 429. Sacrificado. Lesões hepaticas da febre amarella experimental.
M. rhesus 455 Ar. Cl.	10 dias		Presentes	Sacrificado. Lesões hepaticas da febre amarella experimental.
M. rhesus 467 Ar.	12 dias		Presentes	Inoculado com sangue do *rhesus* 449. Morte expontanea.
M. rhesus 434 Ar. Cl.	25 dias		Presentes	Inoculado a 26/V/929 com excreta de 6 mosquitos infectados ha cinco dias. Reinoculado a 13/VI com sangue viruiento. Sacrificado a 8/VII.

1 — Material obtido por gentileza dos Drs. H. de Beaurepaire Aragão e A. da Costa Lima.

QUADRO V

Macacos inoculados com emulsão de figado virulento (diversas amostras brasileiras do virus da febre amarella).

N. do animal injectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensivel (*M. rhesus*)	Inclusões intranucleares typicos na cellula hepatica	Observações
M. rhesus 21 C. Mn.	5 dias		Presentes; raras	Inoculado com figado do *rhesus* 17 (amostra F. W.). Morte expontanea.
M. rhesus 19 C. Mn.	5 dias	Positivo	Ausentes	Inoculado com figado do *rhesus* 16 (amostra F. W.). Sacrificado.
M. rhesus 22 C. Mn.	5 dias		Presentes; não abundantes	Inoculado com figado do *rhesus* 19 (amostra F. W. Sacrificado.
M. rhesus 14 C. Mn.	6 dias	Positivo	Presentes; não abundantes	Inoculado com figado do *rhesus* 8 (amostra F. W.). Abcesso na parede do abdomen. Sacrificado.
M. rhesus 17 C. Mn.	6 dias	Positivo	Presentes; não abundantes	Inoculado com figado do *rhesus* 14 (amostra F. W.) Morte expontanea.
M. rhesus 8 C. Mn.	8 dias	Positivo	Presentes; não abundantes	Inoculado com figado do *rhesus* 6 (amostra F. W.). Sacrificado.
M. rhesus 28 C. Mn.	9 dias		Ausentes	Apresentou febre. Tornando-se normal a temperatura foi sacrificado. Inoculado com figado do *rhesus* 25 (amostra F. W.).
M. rhesus 23 C. Mn.	10 dias		Presentes	Inoculado com figado do *rhesus* 17 (amostra F. W.). Morte expontanea.
M. rhesus 120 Ar.	11 dias		Ausentes	Apresentou elevações thermicas irregulares. Sacrificado.

M. rhesus 36 C. Mn.	12 dias		Ausentes	Inoculado com figado do *rhesus* 32 (amostra F. W.). O *rhesus* 32 foi picado por 2 mosquitos apparentemente não infectados.
M. rhesus 9 C. Mn.	18 dias		Ausentes	Injectado com filtrado de emulsão de figado de um *rhesus* inoculado com virus (amostra F. W.) e morto de septicemia.
M. rhesus 116 Ar.	19 dias		Ausentes	Apresentou curva thermica irregular. Sacrificado. A autopsia mostra numerosos nodulos parasitarios no apice de ambos os pulmões.
M. rhesus 60 Ar.	28 dias		Ausentes	Inoculado com 1 cc. de emulsão de figado do *rhesus* 9 Ar. (quadro I). Exemplar adulto femea, muito emmagrecido, pesando 2100 grs. A autopsia mostra numerosos nodulos parasitarios nos pulmões e intestinos, raros no figado.
M. rhesus 20 C. Mn.	36 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de figado e soro inactivado (aquecido) de um mesmo macaco (*rhesus* 17 amostra F. W.). Morte expontanea.

QUADRO VI

Macacos inoculados com emulsão de figado virulento (virus africano Asibi).

N. do animal infeciado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensivel (*M. rhesus*)	Inclusões intranucleares typicos da cellula hepathica	Observações
M. rhesus 56 C. Mn.	3 dias		Presentes; não abundantes	Inoculado com soro de convalescente e virus. Morte expontanea.
M. rhesus 57 C. Mn.	3 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de figado recentemente extrahido do *rhesus* 53. Sacrificado quando apresentava 40º9C. de temperatura.
M. rhesus 58 C. Mn.	3 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de figado do *rhesus* 57, recentemente extrahido. Morte expontanea.
M. rhesus 51 C. Mn.	4 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de figado do *rhesus* 207 Ar. recentemente retirado do animal. Morte expontanea.
M. rhesus 52 C. Mn.	4 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de figado do *rhesus* 207 Ar. recentemente extrahido. Sacrificado.
M. rhesus 55 C. Mn.	5 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de figado do *rhesus* 51 conservado durante um dia na geladeira. Morte expontanea.
M. rhesus 54 C. Mn.	6 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de figado do *rhesus* 51 e egual quantidade de soro (aquecido e 55ºC.) do *rhesus* 50. Morte expontanea.

M. rhesus 204 Ar.	7 dias		Presentes; não abundantes	Inoculado com 2 cc. de soro de um individuo que se suspeitava ter tido febre amarella e, no dia seguinte, com 1 cc. de emulsão de figado do *rhesus* 198 Ar. Morte expontanea.
M. rhesus 50 C. Mn.	7 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de figado; o orgão foi guardado na geladeira durante sete dias. Morte expontanea.
M. rhesus 62 C. Mn.	7 dias		Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de figado do *rhesus* 58, tendo sido o orgão guardado na geladeira durante quatro dias. Sacrificado em agonia.

QUADRO VII

Macacos inoculados com emulsão ou com excreta de Aedes aegypti infectados.

N. do animal injectado	Duração da molestia experimental	Resultado da inoculação em animal sensivel (*M. rhesus*)	Inclusões nucleares typicos na cellula hepatica	Observações
M. rhesus 24 C. Mn.	3 dias		Ausentes	Inoculado com emulsão de mosquitos infectados (virus brasileiro F. W.). Morte expontanea.
M. rhesus 24 C. Mn.	4 dias		Ausentes	Inoculado com emulsão de mosquitos infectados no *rhesus* 32 (virus brasileiro F. W.). Sacrificado em agonia.
M. rhesus 412 Ar.	5 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de mosquitos machos infectados (virus africano Asibi).
M. rhesus 273 Ar.	7 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de cinco mosquitos infectados (virus africano Asibi). Morte expontanea.
M. rhesus 482 Ar.	7 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de dois mosquitos machos infectados (virus africano Asibi). Morte expontanea.
M. rhesus 428 Ar.	9 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Infectado com excreta de mosquitos contaminados depositado sobre a pelle (virus africano Asibi).
M. rhesus 479 Ar. Cl.	9 dias	Positivo	Presentes	Infectado com excreta de dois mosquitos contaminados (virus africano Asibi). Morte expontanea.
M. rhesus 19 Ar.	10 dias		Ausentes	Inoculado com mosquitos infectados cinco dias antes em um caso grave de febre amarella. Sacrificado.

M. rhesus Ar. Tx. [1]	10 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Inoculado com emulsão de cinco mosquitos infectados (virus brasileiro). Sacrificado.
M. rhesus 483 Ar.	10 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de quatro mosquitos infectados. Sacrificado.
M. rhesus 459 Ar. Cl.	12 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de mosquitos infectados (virus africano Asibi). Sacrificado.
M. rhesus 429 Ar. Cl.	14 dias	Positivo	Presentes	Inoculado com pernas trituradas de mosquitos infectados (virus africano Asibi). Morte expontanea.
M. rhesus 449 Ar.	14 dias	Positivo	Presentes; abundantes	Infectado com excreta de mosquitos depositado sobre a pelle (virus africano Asibi).
M. rhesus 456 Ar.	17 dias		Presentes	Inoculado com excreta de dois mosquitos infectados (virus africano Asibi). a 8/VI. Reinoculado a 24/VI, a tarde. Morte na manhã de 25/VI.
M. rhesus 464 Ar. Cl.	21 dias		Presentes	Inoculado com emulsão de mosquitos machos infectados (virus africano Asibi) a 10/VI. Amanheceu morto a 1/VII. A autopsia mostra lesões typicas de febre amarella experimental no figado.

[1] — Material devido á gentileza dos Drs. H. de Beaurepaire Aragão e José Teixeira.

QUA

Alterações nucleares da cell

Caso N.	Sexo	Edade	Raça e nacionalidade	Periodo da molestia em que se deu o obito	Tempo decorrido entre a hora da morte e inicio da autopsia	Inclusão na
5271	feminino	4 annos	branca, brasileira	40 horas	30 minutos	Pres re
2485	masculino		brasileiro	cerca de 48 horas		
5400	masculino	26 annos	branco, portuguez	3o. dia	22 hs. 30 minutos	
6005	masculino	19 annos	branco, portuguez	3o. dia	13 hs. 30 minutos	
2484	masculino			4o. dia		
5403	masculino	38 annos	branco, portugnez	5o. dia	4 hs. 30 minutos	
5395	masculino	39 annos	branco, portuguez	5o. dia	6 hs. 30 minutos	
2530	masculino	21 annos	branco	5o. dia	21 horas	
5396	masculino	19 annos	branco, brasileiro	6o. dia	23 minutos	pre
5390	masculino	31 annos	branco, austriaco	7o. dia	5 horas	
5284	masculino	26 annos	branco, suisso	7o. dia	3 horas	
4134	feminino	15 annos	branca	7o. dia		
5407	masculino	22 annos	mulato, brasileiro	8o. dia	40 minutos	
5406	masculino	22 annos	mulato, brasileiro	9o. dia	9 horas	
5402	masculino	13 annos	mulato, brasileiro		12 horas	
5397	masculino	40 annos	branco, portuguez		1 hora 10 minutos	

DRO VIII

ula hepatica na febre amarella.

ões intra-nucleares cellula hepatica	Granulos erythrocytiformes	Particulas acidophilas	"Empty nuclei"	Basophilia do nucleo-plasma	Tumefacção do nucleolo	Multiplicidade do nucleolo
entes e typicos; elativamente abundantes	presentes					presente
presentes	presentes					presente
ausentes		presentes				presente
ausentes						
ausentes		presentes			presente	presente
ausentes	presentes	presentes			presente	
ausentes	presentes	presentes				
ausentes	presentes	presentes	presentes			
sentes; raros	present. abundantes		presentes			presente
ausentes		presentes			presente	presente
ausentes	present. abundantes				presente	
ausentes						
ausentes	presentes ás vezes 5 ou 6 em um mesmo nucleo	presentes			presente	presente
ausentes		presentes		presente	presente	presente
ausentes	presentes raros	presentes		presente	presente	presente
ausentes	presentes raros	presentes	presentes		presente	presente

QU

Alterações nuclea

N. de autopsia	Diagnostico anatomico	Corpusculos intranuclea-res das doenças do "kario vikon group"	Granulos throcytifo
1826	Carcinoma do figado	ausentes	
1827	Tuberculose	ausentes	
1837	Malaria	ausentes	
1851	Pancreatite hemorrhagica	ausentes	presen
1960	Leptomeningite purulenta (meningococco)	ausentes	
2250	Nephrite chronica	ausentes	
2332	Febre typhoide	ausentes	
2344	Endocardite verrucosa mitral	ausentes	presen
2425	Pancreatite hemorrhagica	ausentes	present
2431	Malaria	ausentes	
2445	Hepatite intersticial chronica	ausentes	
2543	Cholangite e abcessos no figado	ausentes	
2544	Malaria	ausentes	
2555	Endocardite aortica	ausentes	
2558	Carcinoma da vericula biliar	ausentes	
5004	Septicemia	ausentes	present
5010	Hepatite intnrsticial chronica	ausentes	
5011	Nephrite chronica	ausentes	
5018	Colite ulcerosa e anemia	ausentes	
5023	Tuberculose	ausentes	

ADRO IX

res da cellula hepatica

ery-mes	Particulas acido-philas	"Empty nuclei"	Vacuolos nuclea-res com mate-rial acidophilo	Basophillia do nucleo-plasma	Tumefacção do nucleolo	Multiplicidade do nucleolo
	presentes		presentes		presente	presente
	presentes					
			presentes		presente	
es						
				presente	presente	
				presente		
es		presentes				
es	presentes	presentes				
	presentes				presente	
				presente		
					presente	
	presentes				presente	
	presentes				presente	
es						
			presentes		presente	
			presentes			
				presente		

Podemos comprehender esse facto, admittindo que as inclusões intranucleares representam apenas uma necrose parcial do nucleo e constituem uma alteração que persiste mesmo depois de completo desapparecimento do agente nocivo. Se tal agente nocivo é um micro-organismo vivo ultramicroscopico, é mesmo mais provavel que a sua vida e reproducção sejam antes desfavorecidas do que estimuladas quando a meronecrose se apresenta já bem constituida.

INCLUSÕES NA FEBRE AMARELLA E NO HERPES

Haviamos notado, no nucleo das cellulas hepaticas de *M. rhesus* infectados pelo virus da febre amarella (amostras brasileiras e africana «Asibi» não só a independencia de séde e de reacções corantes entre o nucleolo e os corpusculos intranucleares especificos, como a persistencia do nucleolo até phases finaes da degeneração oxychromatica.

Assim, em desenhos em negro (Torres, 1928 b, figs. *d, e* e *h*, 1928 c, figs. *c*, e *e*, 1929 d, figs. *b, c, f, g, h, i*), e em uma estampa colorida (Torres, 1929 a), o nucleolo é frequentemente figurado ao lado da inclusão intranuclear. Na estampa colorida, de facto, todas as figuras o apresentem, mesmo as figs. *i, j* e *k*, as quaes «show the end stages of oxychromatic nuclear degeneration»; na fig. *h*, onde o nucleolo não é representado, o texto informa que «the plane of sectioning accounts probably for it».

Cowdry e Kitchen estudando cortes de figado montados lado a lado, quer de *M. rhesus* apresentando inclusões da febre amarella, quer de *Cebus hypoleucus* contendo inclusões do herpes, estabeleceram, por comparação directa, differenças entre as duas especies de inclusões. Entre outras, citam discordancia nas reacções de coloração, na separação ou clivagem entre constituintes acidophilos e basophilos do nucleo, etc. Outra differença é a maior uniformidade de «individual particles» na febre amarella do que no herpes. «The typical droplets of variable size and the amorphous masses seen in herpes, are almost never met with in yellow fever».

Concluindo de accordo com as suas observações, Cowdry e Kitchen escrevem:

«Though no microchemical difference could be detected the process of inclusion formation in herpes is radically different from that found in yellow fever. The inclusion arises in herpes, not as a regular individual spherical clumps composed of closely packed fine particles, but as a more or less even cloud-like deposits of acidophilic particles in the centers of the affected nuclei. The nucleoli,

moreover, do not persist in herpes as in yellow fever, but are destroyed, or else soon marginate with the rest of the basophilic chromatin on the nuclear membrane». (Cowdry and Kitchen, 1930).

A persistencia do nucleolo nas inclusões da febre amarella e o seu desapparecimento precoce nas do herpes, constituem um dos mais evidentes caracteres differenciaes entre as duas inclusões, segundo Cowdry e Kitchen.

A proposito devemos dizer que nunca, desde o inicio dos estudos, julgamos identicas as inclusões da febre amarella e as do herpes. Escrevemos em Setembro de 1928:

«Em um segundo grupo (de doenças de virus filtraveis), estão aquellas em que as inclusões se localisam exclusivamente no nucleo, taes, entre outras, o herpes simples, o herpes symptomatico, o virus III do coelho e a varicella... A verificação que acabamos de fazer leva a incluir a febre amarella no segundo grupo acima citado». (Torres, 1928g).

Rivers, Haagen e Muckenfuss (1929 a) conseguiram um methodo pelo qual tecidos receptiveis infectados e cultivados *in vitro* evidenciam de um modo regular as alterações intracellulares visiveis caracteristicas da infecção por determinados virus.

Enucleando o globo ocular do coelho, inoculando o virus da vaccina e do herpes por escarificação da cornea e em seguida excisando-a e transportando-a para o meio de cultura, aquelles autores conseguiram abundantes e typicos corpusculos de Guarnieri no cytoplasma das cellulas epitheliaes da cornea infectada com o virus da vaccina e numerosas inclusões acidophilas nos nucleos das cellulas lesadas pelo virus herpetico.

Como preliminar a uma possivel applicação do methodo de Rivers, Haagen e Muckenfuss á cultura do virus amarillico, escarificamos com vaccinostylo a cornea direita de cinco coelhos, nella depositando sôro recente de *Macacus rhesus* infectado pelo virus da febre amarella (amostra franceza) e sangrando no primeiro dia de febre. As palpebras do coelho foram impedidas de recobrirem o globo ocular durante cerca de cinco minutos após a inoculação.

Os coelhos foram sacrificados, respectivamente, dois no quarto dia, um no quinto, um no setimo e outro no decimo quinto dias que se seguiram á inoculação.

O globo ocular, ora intacto, ora perfurado, bem como fragmentos de figado, foram fixados no Zenker-acetico. A cornea posteriormente excisada, foi incluida em parafina e os seus córtes histologicos corados pela hematoxylina-eosina não mostraram corpusculos intranucleares da febre

amarella nas cellulas epitheliaes da cornea; tambem elles não existiam nas cellulas hepaticas.

Os pontos de escarificação, nos animaes do quarto dia, eram por vezes reconheciveis nos cortes histologicos pela hyperplasia das cellulas epitheliaes e espessamento local da cornea.

Com o mesmo material usado nas experiencias com os coelhos (sôro de *M. rhesus* recentemente colhido em um animal injectado com amostra «Franceza» e que estava no primeiro dia de febre) inoculamos dois *Pseudocebus azarae,* macaco que, segundo Aragão (1929 b) apresenta reacção febril quando contaminado pelo virus da febre amarella.

A inoculação foi feita por via intraperitoneal e por escarificação do globo ocular direito.

Um dos animaes morreu de peritonite no sexto dia de inoculação. O outro foi sacrificado no decimo primeiro dia.

Tambem a pesquiza de corpusculos intranucleares especificos foi negativa, quer nas cellulas epitheliaes da cornea, quer nas do figado.

Na verdade não encontramos no figado nem inclusões nucleares nem outras lesões que fizeram suspeitar de uma infecção do *Pseudocebus azarae* pelo virus amarillico.

E' evidente que os nossos resultados foram conseguidos em numero muito pequeno de animaes e possivelmente esses não foram sacrificados na occasião mais opportuna para a producção de inclusões no coelho e no macaco *Pseudocebus*.

Confirmados que sejam, estabelecerão um caracter biologico differencial entre os virus do herpes e os da febre amarella, a se juntar aos caracteres morphologicos estabelecidos por Cowdry e Kitchen.

DISCUSSÃO

Dissemos que as inclusões da febre amarella são formadas por uma substancia fundamental e por um stroma.

A substancia fundamental é uma nucleoproteina acidophila, apparentemente extranha, em grande extensão, ao nucleoplasma normal.

E' bem sabido que, de um modo geral, quando as cellulas soffrem necrose, algumas de suas albuminas constitutivas, seja no nucleo, ou seja no cytoplasma, tornam-se fortemente acidophilas.

O que é peculiar e caracterisa a degeneração oxychromatica na febre amarella, distinguindo-a da necrose commum, é que as estructuras acidophilas são formadas, no principio, *apenas em alguns pontos* do nucleoplasma, ao passo que outros permanecem inteiramente livres de es-

tructuras acidophilas. Estes ultimos formam o espaço claro ou halo caracteristico, que circumda as inclusões.

No que respeita ao stroma, elle é simplesmente o reticulo de linina aprisionado pela substancia fundamental e cujas alterações se reconhecem pela tumefacção, acidophilia e encarquilhamento do reticulo bem como pela lyse das particulas de basichromatina.

Uma differença notada entre as alterações do reticulo de linina na degeneração oxychromatica da febre amarella e as que elle apresenta em outros processos regressivos (necrose, necrobiose), é que só são attingidas e soffrem tumefacção, acidophilia e lyse, as porções do reticulo englobadas pela substancia fundamental. A porção restante do reticulo, que pode ser apreciada, embora em pequena quantidade, no espaço claro que circumda a inclusão, cora-se geralmente bem; as alterações que soffre em porção do reticulo de linina (dilaceração) são claramente menos intensas do que as da porção situada no interior das inclusões.

Em resumo, o stroma representa uma alteração local do reticulo de linina; as suas modificações, lyse, acidophilia, tumefacção são habitualmente encontradas em processos regressivos.

No que respeita ao nucleolo, elle é topographicamente distincto das inclusões até phase adiantada do processo.

Os factos citados suggerem que as inclusões da febre amarella representam simplesmente uma necrose circumscripta do nucleoplasma e do reticulo de linina; tal necrose interessa apenas alguns dos seus componentes, ao passo que outros se apresentam mais ou menos bem conservados.

Com effeito, ao passo que alterações mais ou menos accentuadas occorrem no nucleoplasma, a membrana nuclear apresenta apenas tumefacção, em muitos casos, ligeira, de sua basichromatina, e as alterações nucleolares não são, tambem, accentuadas nas phases precoces de formação das inclusões.

O estudo de preparados fixados e corados, por conseguinte, mostra que as alterações que sobrevem no nucleo da cellula hepatica e dão logar á formação de inclusões da febre amarella, apresentam caracteres geraes, taes a tumefacção, lyse e acidophilia peculiares á necrose commum. Nos primeiros estadios, comtudo, taes lesões mais accentuadas e mais adiantadas em alguns componentes nucleares, ou melhor, em algumas porções de alguns componentes nucleares, ao passo que outras porções desses mesmos componentes e bem assim outros elementos do nucleo, não apresentam alterações de necrose.

Taes factos suggerem fortemente uma «necrose parcial do nucleo», queremos dizer, uma necrose que interessa, a principio, alguns constituintes do nucleo, ao passo que outros são mais ou menos conservados.

Que informações fornece, de outro lado, o estudo das inclusões da febre amarella em cellulas examinadas a fresco e coradas por corantes vitaes ?.

A proposito será util recordar a opinião de Langeron sobre as interpretações que o observador está autorisado a fazer, quando realisa o exame de cellulas em estado vivo e coradas por corantes vitaes:

«Les colorations vitales permettent de démontrer la réalité de l'existence de certaines inclusions cellulaires qui pourraient être prises pour des précipités colorés, autrement dit, pour des artifices de préparation. Cette existente réelle ne sera prouvée qu'autant que la coloration aura eu lieu sans que la vie de la cellule soit arrêtée... Il faut savoir en outre que, *parmi les inclusions cellulaires, tout ce qui se colore n'est pas vivant:* des pigments divers et des cadavres de bactéries se colorent souvent très intensement... La valeur des colorations vitales est très contestable et très contestée. Des techniciens de premier ordre, comme Galeotti, Lee, Mayer, arrivent à conclure que les résultats obtenus ne constituent pas de véritables colorations. Le colorant peut diffuser dans la cellule vivante, mais ne produit pas une véritable teinture. *Généralement le noyau, et particulièrement la chromatine, ne se colorent pas; si la coloration se produit, c'est que la cellule est morte*». [1]

Depois de ler o trecho acima transcripto, não se pode evitar a ideia de que a observação a fresco e coloração vital das inclusões intranucleares na febre amarella sejam antes favoraveis do que contrarias á existencia de uma necrose parcial do nucleo como explicação das chamadas inclusões intranucleares.

Senão vejamos pela transcripção parcial da cuidadosa descripção de Cowdry e Kitchen (1929 e 1930):

«That the inclusions are present as such in the living animal and do not in any sense represent the coagulating action of the fixative is shown by the ease with which we have been able to study them in liver cells quickly removed from a chloroformed animal and examined in physiological salt solution. The addition of a supravital stain is not even necessary, since the refractive index of the individual particles is sufficiently different from that of the surrounding nuclear substance to render them easily visible with both direct and obliquo illumination...». «*The particles became tinged when a trace of eosin is added to the salt solution, and are colored more intensely than any other elements in the cell when a little phloxin red is applied in the same way.* In such supravital preparations they may be studied with ease and the details of their morphology and to-

[1] Os gryphos são nossos.

pography can be distinguished rather better than in fixed and stained preparations, particularly if a binocular microscope giving perspective is employed. It is readily seen by focusing up and down through entire nuclei that clumps of particles which in thin sections appear to be isolated, are, in reality, often in contact with one another. Frequently there is a central mass, from which clumps of particles stretch out like arms... No indications have been observed of independent motility or of multiplication by division, nor have we detected any increase in size of the particles through accretion or condensation of further materials on their surfaces. The uniformity in size of the particles is noteworthy. They do not grade down past the border line of visibility, nor are there any specially large ones».

«The intranuclear inclusions... can be stained supravitally by dissolving small amounts of various dyes in the salt solution in which the cells are to be examined. They are tinged with eosin, methylene blue, and neutral red *and are colored more intensely than any other elements in the cell* [2] when phloxin red is applied in this way».

«The solubilities of the inclusions can likewise be tested in the fresh state without the addition of any dye.

... After this dilution with the saline solution the effective concentration of acetic acid is only about 0.05 per cent. The inclusions are dissolved apparently the moment that the acetic acid gains access to them, not one by one but *en masse*. The nucleolus disappears a few second later...».

Alguns dos pormenores da descripção de Cowdry e Kitchen, taes «the uniformity in size of the particles is noteworthy» e «clumps of particles which in thin sections appear to be isolated, are in reality, often in contact with one another. Frequently there is a central mass, from which clumps of particles stretch out like arms...», singularmente se ajustam ás nossas verificações em preparados corados, a respeito de um «stroma» do corpusculo intranuclear, constituido pelo reticulo de linina com as particulas de basichromatina nelle incrustadas.

De outro lado, a notavel affinidade para a phloxin red, que apresenta a fresco a inclusão, em contraste com os outros elementos da cellula, é um argumento favoravel á necrose circumscripta do nucleo.

Em conclusão podemos dizer que muitos factos observados suggerem, e outros não contrariam, a asserção de que nas cellulas hepaticas de *M. rhesus* injectados com o virus da febre amarella e em cellulas hepatica, de casos humanos de febre amarella, occorre uma necrose que, no começo e durante certo tempo, interessa apenas determinados componentes do nucleo ao passo que outros são, apparentemente, conservados. Seria, assim, uma necrose parcial do nucleo.

Como hypothese de trabalho admittiremos que nas doenças pro-

[2] Os gryphos são nossos.

duzidas por virus filtraveis e ultramicroscopicos nas quaes existem «inclusões cellulares» caracteristicas, occorre um processo regressivo peculiar que designamos pelo termo de «meronecrose» (de *meros* — parte — necrose).

A «meronecrose» é uma necrose que não interessa nem apenas uma cellula isolada, nem isoladamente o nucleo ou o cytoplasma de uma cellula isolada, mas apenas determinados componentes, quer unicamente do nucleo (doenças do «karyo-oikon group» de Lipschütz), quer sómente do cytoplasma (doenças do grupo «cyto-oikon»), quer tanto do nucleo quanto do cftoplasma (doença do grupo «cyto-karyo-oikon»). A melhor caracteristica da meronecrose é a seguinte: emquanto determinados componentes do nucleo ou do cytoplasma apresentam signaes de necrose em adiantada phase de evolução, outros componentes do mesmo nucleo ou cytoplasma são apparentemente poupados, pelo menos nos primeiros estadios.

A meronecrose traz á observação constituintes cellulares que de ordinario são inapparentes no interior da cellula e que, em sua maior parte, são derivados de componentes da propria cellula. Outra caracteristica da meronecrose, distinguindo-a em cada doença, é a sua affinidade ou especificidade não só para determinada especie cellular, mas ainda, do mesmo modo, para determinados componentes de cada uma dessas cellulas especificamente compromettidas. Taes componentes seriam, na febre amarella, o nucleoplasma, no herpes, o nucleoplasma e o nucleolo, na raiva, as neurofibrilas e o chondrioma, e assim por diante.

Acreditamos que a hypothese da «meronecrose» é afinal uma simples questão de palavras.

No entanto ella seria muito commoda para os pathologistas que assim comprehenderiam melhor as alterações especificas das doenças de virus como um caso especial de processos geraes com que estão familiarisados (processos regressivos), do que como «inclusões cellulares», corpusculos de natureza obscura ou chlamydozoarios.

Em nosologia a hypothese da «meronecrose» viria explicar porque doenças tão diversas, taes a raiva, a febre amarella e o herpes, pertencem a um mesmo grupo nosologico: a meronecrose não é um processo regressivo geral compromettendo indifferentemente numeroso grupo de cellulas; é, ao contrario e caracteristicamente um processo regressivo com elevada especificidade cellular, interessando isoladamente ora a cellula nervosa, ora a hepatica, ora a epithelial de revestimento, dando logar, assim, a uma symptomatologia muito dissemelhante.

A hypothese da «meronecrose» tambem se accorda com a doutrina

etiologica mais acceita neste grupo de doenças: a que reconhece como agente causal um organismo vivo ultramicroscopico; a sua pronunciada especificidade cellular exemplificaria um histo e cytotropismo do agente causal.

Finalmente, é ainda curioso que ella singularmente se accorde com um importante detalhe da biologia dos virus ultramicroscopicos, a saber: aquelles que, até agora tem sido cultivados, só o foram em meios que continham cellulas vivas. Este ultimo ponto de modo algum discorda da hypothese segundo a qual, apresentando cytotropismo mais ou menos estreito, taes micro-organismos só conseguem crescimento e multiplicação em meios artificiaes, quando localisados em determinados componentes da cellula; o seu desenvolvimento se acompanha da «meronecrose» especifica («corpusculos especificos», «inclusões cellulares», chlamydozoarios, etc.).

Interessantes pesquizas de Rivers, Haagen e Muckenfurs (1929 *a* e *b*), vem em apoio do que acima dissemos. Esses autores, tendo conseguido a cultura dos virus da vaccina e do herpes em fragmentos excisados da cornea do coelho, empregam como criterio para decidir os seus resultados, a presença da meronecrose especifica («inclusões cellulares») da vaccina e do herpes. Estabelecem, assim, que a cultura de taes virus está regularmente associada á formação de inclusões caracteristicas nas cellulas vivas do meio de cultura.

A meronecrose seria um apanagio exclusivo das doenças de virus filtravel em virtude do modo de acção especial desses agentes infectuosos. Os processos communs de necrose e necrobiose são occasionados, na maior parte das vezes, por causas agindo do exterior sobre a cellula, quaes sejam causas toxicas (toxinas), alterações circulatorias (anemia local, congestão) influenciando o metabolismo cellular. Isso explicaria o aspecto geral que ellas apresentam em grande numero de circumstancias.

No caso das doenças de virus filtraveis, ao contrario, a meronecrose estaria ligada á acção directa de um agente infectuoso *in loco* dentro da cellula, e ainda mais, em determinadas zonas da cellula; estas seriam o cytoplasma, na raiva, o cytoplasma e o nucleo, na vaccina, exclusivamente o nucleo, na febre amarella e no herpes.

RESUMO

1—No interior do nucleo de cellulas hepaticas de *Macacus rhesus* e *M. cynomolgus* (figs. 13—34) inoculado com o virus da febre amarella e de cellulas hepaticas de doentes de febre amarella (figs. 61-65 e 68-69) occorre o processo regressivo referido na litteratura sob o nome de «de-

generação oxychromatica». Tal processo apresenta grande intensidade nos macacos, sendo, porém, assaz escasso no material humano colhido em autopsias.

Esta alteração está intimamente associada ao effeito nocivo causado pelo proprio virus da febre amarella, sendo, nesse sentido, a unica alteração verdadeiramente especifica na febre amarella.

Não foram encontradas alterações do cytoplasma nem granulos intracellulares que tivessem relação com o virus da febre amarella.

Assim sendo, a febre amarella pertencerá ao grupo de doenças de virus filtraveis produzindo alterações cellulares caracteristicas ou corpusculos especificos, exclusivamente limitados ao nucleo. Deve ser incluida, portanto no grupo karyo-oikon da classificação de Lipschütz, juntamente com o herpes, varicella, virus III do coelho, «submaxillary disease», etc.

Como acontece em geral, nas doenças de virus filtraveis, formando inclusões intracellulares, observa-se na febre amarella que a inclusão cellular especifica predomina ou existe exclusivamente em determinada especie cellular. Até agora, no nosso material só conseguimos evidenciar a degeneração oxychromatica da febre amarella na cellula hepatica. Quando existe, porém, a sua abundancia é notavel, não raro attingido a quasi totalidade das cellulas hepaticas nos cortes histologicos examinados. Esse facto não poude ser observado nos casos humanos que examinamos, provavelmente em virtude de condições proprias do virus no homem e da phase da molestia na qual foi retirado o material para estudo.

Nas cellulas da camada cortical das suprarenaes de *M. rhesus* infectados encontramos aspectos nucleares suggestivos de degeneração oxychromatica (figs. 37 e 40); são escassos e de caracterisação duvidosa em virtude da concomitancia de alterações necrobioticas não especificas.

2—Durante a epidemia de febre amarella em 1928 no Rio de Janeiro, notamos differenças assaz pronunciadas entre as lesões hepaticas no homem e no *M. rhesus*.

Taes differenças, existindo em material assaz homogeneo quanto ás amostras de virus em questão, nos levam a concluir que a capacidade de formar corpusculos intranucleares especificos, como tambem a já conhecida permanencia do virus no sangue e nos tecidos, depende, de modo evidente, da especie animal usada e não da propria amostra empregada, nem do numero de passagens que ella soffreu no macaco.

Embora os doentes pertencessem a raças differentes (quadro VIII) e embora, possivelmente diversas amostras de virus tenham sido nelles inoculadas, estamos autorisados a concluir que a amostra ou amostras que

infectaram o homem na epidemia de 1928, no Rio de Janeiro, possuem nelle uma fraca capacidade de determinar inclusões intranucleares.

Ao contrario, a mesma amostra ou amostras são capazes de produzir no *M. rhesus*, logo na primeira passagem, inclusões intranucleares assaz abundantes.

Outra differença que notamos e attribuimos a especie animal empregada foi: as alterações hepaticas de natureza toxica e circulatoria (congestão, necrose e necrobiose da cellula hepatica) são nitidamente mais intensas no homem que nos macacos injectados com as amostras brasileiras do virus da febre amarella isoladas durante a epidemia de 1928 no Rio de Janeiro.

Conseguimos, no homem, evidencia de inclusões typicas na cellula hepatica, apenas em tres casos dentre dezesete examinados.

Esse resultado, provavelmente, ainda não é definitivo, indicando, apenas a raridade extrema que os corpusculos podem apresentar nos casos de febre amarella que ordinariamente chegam á autopsia.

Tambem não realisamos uma pesquiza exhaustiva dos corpusculos em outros orgãos além do figado.

O caso no qual encontramos em maior abundancia os corpusculos intranucleares, offerecia duas circumstancias que isoladamente, e, com maior razão, associadas, não são habituaes em material de autopsia de febre amarella, a saber: trata-se de uma creança fallecida cerca de 40 horas após o inicio da molestia e a autopsia foi iniciada 30 minutos após o obito.

Notamos que, quando em uma preparação é encontrada uma cellula hepatica com inclusão, o exame não tarda em demonstrar, em campos microscopicos visinhos, uma ou outra cellula tambem com inclusão, ao passo que em pontos mais distantes nenhuma cellula é encontrada apresentando inclusões. Esses «fócos» de cellulas com inclusões nem sempre são faceis de encontrar, o que está de accôrdo com as differenças topographicas de outras lesões hepaticas, referidas por Oskar Klotz (1928) e Hudson (1928).

3—A degeneração oxychromatica é um processo regressivo nuclear, no qual tomam parte predominante elementos presentes no nucleo normal de cellulas tratadas pelos fixadores habituaes.

São elles: a oxychromatina, o reticulo de linina e as particulas de basichromatina neste ultimo incrustadas; de mistura e associadas á oxychromatina existem provavelmente outras albuminas nucleares acidophilas oriundas do nucleoplasma em condições pathologicas do nucleo.

Apenas esses elementos se apresentam alterados, quer quantitativa-

mente, quer em seu aspecto e disposição reciproca, quer em suas affinidades tinctoriaes.

O facto importante a reter é que taes modificações regressivas interessam, no inicio, unicamente determinadas partes componentes do nucleo com exclusão de outras e reproduzem nas cellulas hepaticas de animaes infectados, de maneira constante e regular, aspectos nucleares absolutamente typicos e especificos da infecção pelo virus amarillico.

4—O corpusculo intranuclear da febre amarella, em phases typicas (figs. 69 e 71) mostra-se constituido por uma «substancia fundamental» e por um «stroma».

A substancia fundamental é uma albumina nuclear basica, em parte formada pela oxychromatina ou lanthanina, em parte por outras nucleoproteinas oriundas do nucleoplasma. E' ella a porção componente que confere ao corpusculo accentuada acidophilia, e portanto aquella a que se reporta a designação usual de «acidophilic intranuclear inclusion».

Apresenta-se condensada na porção central do nucleo, sendo separada da membrana nuclear por um typico halo claro de nucleoplasma.

O «stroma» é formado pelo reticulo de linina e particulas de basichromatina, estructuras essas que occupam a zona central do nucleo onde se acha condensada a substancia fundamental. O reticulo de linina é tumefacto e menos nitido que no normal; as particulas da basichromatina, de dimensões pequenas mas notavelmente uniformes, coram-se umas ainda bem pelos corantes basicos, ao passo que outras soffrem *lyse*. O stroma é melhor apreciado nos preparados pelo bordo-hemalaun de Meyer, porque ahi a substancia fundamental é menos intensamente corada que que pela phloxin red.

Os detalhes precedentes são nitidos quando os corpusculos intranucleares são examinados com Oc. 25 × e Obj. imm. 100 × de Leitz usando como illuminação a luz branca de uma «Speziallampe Leitz» de baixa tensão «Nitra» (6 volts, 6 amp.); a variação de intensidade luminosa que permitte tal apparelho de illuminação e o manejo do diaphragma-iris muito facilitam a observação de taes detalhes de difficil apreciação.

Tambem, adoptando as referidas condições de exame, percebe-se que o halo claro de nucleoplasma que circumda o corpusculo e o separa da membrana nuclear, não é desprovido de estructura. Quasi sempre é possivel ahi reconhecer restos do reticulo de linina; estes geralmente conservam a affinidade normal para os corantes, e assim se distinguem do «stroma» do corpusculo.

O exame cuidadoso mostra qeue esses restos do reticulo de um

lado se inserem sobre a membrana nuclear e do outro lado se continuam com o «stroma» do corpusculo intranuclear em um ou outro ponto.

Nos nucleos que soffreram a degeneração oxychromatica, é caracteristico um notavel augmento de volume da basichromatina situada junto á membrana nuclear. Contrariando a ideia geralmente acceita de que esse augmento de volume seja devido a uma «apposição» ou «marginação» de basichromatina, isto é, a um fusionamento de basichromatina oriunda de outras porções do nucleo com a da membrana nuclear, interpretamos esse augmento de volume como uma «tumefacção local» da basichromatina situada junto á membrana nuclear. Uma tumefacção de basichromatina com aspecto semelhante é referida por Pianese (1896) nas cellulas de tumores (Taf. IV, fig. IV).

5—A apparencia de «granulos acidophilos» que apresentam os corpusculos intranucleares quando examinados com Oc. 4× ou 12× Leitz e Obj. imm. 100×, quer com a luz natural, quer com lampada «Nitra», é um aspecto até certo ponto falso. Elle é corrigido pelo exame com Oc. 25×, Obj. imm. 100× e lampada «Nitra», empregando intensidade luminosa variavel da lampada e aberturas differentes do diaphragma-iris.

Sempre que assim procedemos no nosso material, quer nos corpusculos intranucleares da cellula hepatica do macaco, quer nos do homem, notamos que os «granulos acidophilos» das phases iniciaes da degeneração oxychromatica, correspondiam a uma substancia acidophila, cuja intensidade de coloração variava de ponto para ponto, cujos contornos eram difficeis de precisar e cuja fórma nunca era espherica ou redonda. Tal substancia occupa uma ou diversas malhas do *reticulo de linina alterado* ou «stroma» do corpusculo, o que explica a sua fórma caprichosa.

O aspecto de «granulos acidophilos» apparente ao exame com Oc. 4× e Obj. imm. 100× Leitz e luz natural ou artificial é provavelmente devido á grande luminosidade que em taes circumstancias possue a substancia acidophila (depositada nas malhas do reticulo de linina alterado ou «stroma» do corpusculo), quando comparada e fazendo contraste com o referido reticulo de linina.

Examinados com Oc. 25× e Obj. imm. 100× Leitz e lampada «Nitra» nas condições atraz referidas, os corpusculos intranucleares especificos da febre amarella revelam, na verdade, aspecto granuloso.

Mas os granulos que ahi se encontram não são acidophilos e sim basophilos, correspondendo traço por traço ás finas particulas de basichromatina que normalmente se acham incrustadas no reticulo de linina. Taes granulos, que «apresentam notavel uniformidade de dimensões, embora de fórma irregular» são, por conseguinte, apenas um dos componentes do «stroma» do corpusculo.

Em resumo: examinados os corpusculos com augmento de 2000 — 2500 diametros deixam de existir os «granulos acidophilos» que o exame com 500—1000 diametros fazia suppor como partes constitutivas do corpusculo.

Com o mesmo augmento de 2000 — 2500 diametros o corpusculo mostra um aspecto granuloso; os granulos são, porém, basophilos, e correspondem a particulas de basichromatina que fazem parte do «stroma» do corpusculo; taes granulos basophilos podem ser egualmente e com facilidade apreciados com o augmento de 500—1000 diametros e luz natural, em preparados corados simplesmente pelo hemalaun de Meyer, ou pelo bordo-hemalaum.

6—As cellulas hepaticas de casos humanos de febre amarella mostram pronunciadas alterações da oxychromatina e de nucleoproteinas acidophilas, além das inclusões inntranucleares (Quadro VIII).

Em uma tentativa para estabelecer distincções entre taes alterações que se prestam a confusão com a degeneração oxychromatica, estabelecemos designações provisorias para todos os aspectos nucleares anormaes que, a nosso criterio, se apresentassem com maior constancia e parecessem representar um typo de alteração definido. Distinguimos, assim, «granulos erythrocytiformes», «particulas acidophilas», etc.

Ao passo que em vinte casos de autopsia (Quadro IX) usados como contraprova, os granulos erythrocytiformes eram presentes em seis, as particulas acidophilas (oxychromatina ?) (fig. 56) em cinco, e a multiplicidade de nucleolos apenas em um, em dezesete casos de febre amarella, os granulos erythrocytiformes (figs. 57, 58 e 60), existiam em dez, as particulas acidophilas (fig. 59) em dez, e a multiplicidade de nucleolos (figs. 54 e 51) em dez.

BIBLIOGRAPHIA

ARAGÃO, H. de B. 1929 a—Modernas acquisições sobre a febre amarella experimental. Archivos de Hygiene *3*, 5.

ARAGÃO, H. de B. 1929 b—Febre amarella experimental no Brasil. Brasil Medico, *43*, 849.

BARNARD, J. E. 1930—Ina discussion on «Ultramicroscopic viruses». Proc. Roy. Soc., Series B, *104*, 537.

COWDRY, E. V. 1928—Intracellular pathology in virus diseases in Filtrable Viruses; edited by T. M. Rivers. Baltimore.

COWDRY and KITCHEN, S. F. 1929—Intranuclear inclusions in yellow fever. Science, *69*, 252.

COWDRY and KITCHEN, S. F. 1930—Intranuclear inclusions in yellow fever. The Amer. Jour. of Hyg., *11*, 227.

DAVIS, N. C. and BURKE, A. W. 1929—Studies on South American yellow fever virus. I. The origin of the strains in use at the Yellow Fever Laboratory in Bahia, Brasil. Jour. Exp. Med., *49*, 975.

DAVIS, N. C. and SHANNON, R. C. 1930—The location of yellow fever virus in infected mosquitoes and the possibility of hereditary transmission. The Amer. Journ. of Hyg., *11*, 335.

GOODPASTURE, E. W. 1925 a—Intranuclear inclusions in experimental herpetic lesions of rabbits. Amer. Jour. of Path., *1*, 1.

GOODPASTURE, E. W. 1925 b—A study of rabies, with reference to a neural transmission of the virus in rabbits, and the structure and significance of Negri bodies. Amer. Journ. of Path., *1*, 547.

HINDLE, E. 1929 a—An experimental study of yellow fever. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., March., *22*, 405.

HINDLE, E. 1929 b—In a discussion in «Ultramicroscopic viruses». Proc. Roy. Soc. Series B, *104*, 537.

HINDLE, E. and STEVENSON, A. C. 1929—Oxychromatic nuclear inclusions in yellow fever. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., June, *23*, 3.

HOFFMANN, W. H. 1929 a—in Kolle, W., Kraus, R. u. Uhlenhuth, P.—Hand. d. pathog. Mikroor., Bd. VIII, Lfg. 32.

HOFFMANN, W. H. 1929 b—Einschlüsse in den Leberkernen beim menschilichen Gelbfieber. Arch. f. Schiffs u. Tropen-Hyg., *33*, 411.

HOFFMANN, W. H. 1930—On the nature of the inclusion bodies in yellow fever. Medical Journal and Record, March. 19.

LANGERON, M. 1916—Précis de microscopie Masson & Cie., Paris.

MARTIN, C. 1929—In a discussion «Ultramicroscopic viruses». Proc. Roy. Soc., Series B, *104*, 537.

PENNA, O. e FIGUEIREDO, B. de 1929—Contribuição ao estudo da histopathologia do figado na febre amarella. Folha Medica.

PETTIT, A. 1929—Virus amaril. Biologia médicale, 19, 337.

PIANESE, G. 1896 -Beitrag zur Histologie und Aetiologie des Carcinoms. Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Pathol., Suppl. Hefte I.

PRENANT, A., BOUIN, P. et MAILLARD, L. 1904—Traité d'Histologie, Tome I. Paris.

RIVERS, T. M., HAAGEN, E. and MUCKENFUSS, R. S.—1929 a—A method of studying virus infection and virus immunity in tssue cultures. Proc. of the Soc. of Exper. Biol., and Med., *26*, 494.

RIVERS, T. M., HAAGEN, E. and MUCKENFUSS, R. S. 1929 b—Development in tissue cultures of the intra-cellular changes characteristic of vaccinal and herpetic infections. Jour. of exper. Med., *50*, 665.

ROCHA LIMA, H. da—1912.—Zur pathologischen Anatomie des Gelbfiebers. Verh. d. deut. path. Ges., *15*, 163.

ROCHA LIMA, H. da 1929—Sobre a anatomia pathologica da febre amarella. Folia clinica et biologica, *1*, 4.

SAWYER, W. A., LLOYD, W. D. M., and KITCHEN, S. F. 1929—The preservation of yellow fever virus. Jour. Exper. Med., *50*, 1.

STOKES, A., BAUER, J. H. and HUDSON, N. P. 1928—Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. Amer. Jour. Trop Med., *8*. 103.

TREILER, M. 1930—Susceptibility of white mice to the virus of yellow fever. Science, *71*, 367.

TORRES, C. M. 1928 a—Inclusions nucléaires acidophiles (dégénérescence oxychromatique) dans le foie de *Macacus rhesus* inoculé avec le virus brésilien de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol., *99*, 1344 (Séance du 25 juillet de la Soc. brés. e Biol).

TORRES, C. M. 1928 b—Inclusions intranucléaires et nécrobiose chez *Macacus rhesus* inoculé avec le virus e la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol., 99, 1655 (Séances des 15 et 29 aout, 14 et 26 septembre de la Soc. Brés. de Biol.).

TORRES, C. M. 1928 c—Dégénérescence oxychromatique dans le foie de *Macacus rhesus* et *M. cynomolgus* accompagnant les lésions typiques de la fièvre jaune expérimentale; son absence dans le foie de Singes non inoculés. Ibd., 1660.

TORRES, C. M. 1928 d—Sur la dégénérescence oxychromatique du foie chez les Singes inoculés avec le virus de la fièvre jaune. Ibid., 1669.

TORRES, C. M. 1928 e—Sobre a «necrose salpicada» do figado na febre amarella. Sciencia Medica, nº 8, Agosto.

TORRES, C. M. 1928 f—Sobre a degeneração oxychromatica da cellula hepatica como lesão caracteristica na infecção experimental pelo virus brasileiro da febre amarella. Brasil Medico, nº 36, 8 de Setembro.

TORRES, C. M. 1928 g—Inclusões nucleares acidophilas (degeneração oxychromatica) na febre amarella experimental. Sciencia Medica, 1928, nº 9, Setembro.

TORRES, C. M. 1928 h—Sur l'importance de la dégénérescence oxychromatique des cellules du foie chez *Macacus rhesus* inoculé avec le virus Brésilien de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol., *99*, 1671 (Séances des 15 et 29 août, 14 e 26 septembre 1928 de la Soc. brés. de Biol.).

TORRES, C. M. 1928 i—Alterações nucleares das cellulas do figado nas infecções de *Macacus rhesus* e *M. cynomolgus* pelo virus da febre amarella. Mem. Inst. O. Cruz, Suppl., nº 2, 15 Outubro pg. 55.

TORRES, C. M. 1928 j—Etude par le procédé de Goodpasture et la réaction de Feulgen, des inclusions nucléaires de la fièvre jaune expérimentale. C. R. Soc. Biol., *100*, 966 (Séance du 26 décembre de la Soc. brés. de Biol.).

TORRES, C. M. 1929 a—Intranuclear inclusions in experimental yellow fever. Mem. Inst. O. Cruz, Supp., nº 6, março, pg. 69.

TORRES, C. M. 1929 b—Sur les inclusions nucléaires dans la fièvre jaune expérimentale (virus brésilien et africain). S. R. Soc. Biol., *101*, 951 (Séance du 27 mars, de la Soc. brés. de Biol).

TORRES, C. M. 1929 c—Inclusões nucleares na febre amarella. Brasil-Medico, 6 de Abril.

TORRES, C. M. 1929 d—Altérations nucléaires des cellules du foie chez les Singes inoculés avec le virus brésilien et africain de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol., *101*, 959 (Séance du 24 avril de la Soc. Brésil. de Biol.).

TORRES, C. M. 1929 e—Morphologie des inclusions hépatiques dans la fièvre jaune humaine. C. R. Soc. Biol., *102*, 410 (Séance du 13 júin de la Soc. brés. de Biol.).

TORRES, C. M. 1929 f—Altérations du nucléole des cellules du foie dans la fièvre jaune. *Ibid.*, 414 (Séance du 27 juin de la Soc. brés. de Biol.).

UNN, P. G. 1928—Histochemie der Haut, 1928, F. Deuticke, Leipzig.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS XXVIII—XXX

As figuras 1 a 65 e a figura 68 foram desenhadas com Oc. comp. 6 e obj. imm. homog. 1/12 Zeiss, na altura da mesa, com luz natural.

As figuras 66, 67 e 69 a 72, foram desenhadas com Periplan. Ok. 25B e Obj. imm. Apert. 1,30, 100x de Leitz, usando como apparelho de illuminação a «Speziallampe Nitra» de bajxa tensão (6 volts, 6 amp.) de Leitz. A apreciação dos detalhes referidos com este ultimo augmento é facilitado pela variação na intensidade do fóco luminoso e manobras do diaphragma-iris.

Nas figuras 1 a 8 e figs. 53, 64 e 67, a coloração foi feita pela fuchsina basica e azul de methyleno de Loeffler; nas figs. 9 a 11 e 63 foi usado o mesmo processo, sendo os córtes tratados, depois da coloração e deshydratação, pelo carbol-xylol-oleo de cravo.

Nas figuras 12 a 37, 40 a 48, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 61; 62, 68, 69, 71 e 72 a coloração foi feita pela fuchsina basica e azul de methyleno de Loeffler; nas figs. 9 a 11 e 63 foi usado o mesmo processo, sendo os córtes tratados, depois da coloração e deshydratação, pelo carbol-xylol-oleo de cravo.

Nas figuras 12 a 37, 40 a 48, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 68, 69, 71 72 a a coloração foi a hematoxylina Delafield ou o hemalaun de Meyer e a eosina. Na figura 49 a coloração foi a «Nuclealfärbung» de Feulgen. Nas figuras 50, 51, 66 e 70, a coloração foi feita pela phloxine e azul de toluidina. Nas figuras 38 e 65, a coloração foi o bordo e hemalaun.

Na fig. 37 foi usada a coloração pelo verde de methyla-pyronina de Pappenheim-Unna.

Todos os córtes provém de material fixado em liquido de Zenker, com excepção das figuras 57, 61 e 62, onde o fixador usado foi o formol simples.

ESTAMPA XXVIII

Figs. 1 e 2—Cellulas hepaticas normaes de *Macacus rhesus* 2638 não injectado; chromatina e membrana nuclear em azul, nucleolo em vermelho, cytoplasma em roseo azulado.

Figs. 3 a 11—Cellulas hepaticas de *M. rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII) inoculado com virus da febre amarella (figs. 3, 4 e 5 representam phases iniciaes da

formação das inclusões. Fig. 6 mostra uma inclusão typica («figura em borboleta») corada em azul violeta; nucleolo em vermelho. Fig. 7 mostra uma inclusão typica («figura em calota de esphera») corada em azul violeta; nucleolo em vermelho. Nas figuras 5 e 6, o reticulo de linina e as particulas de basichromatina nelle situadas são reconheciveis no interior da inclusão. Nas figuras 6 e 7 a membrana nuclear é irregularmente espessada em virtude da tumefacção da basichromatina ahi localisada. Nas figuras 4 a 7, leve augmento de volume do nucleo. Figura 8, degeneração oxychromatica em phase adiantada de formação, corada em violeta avermelhado (tonalidade mal reproduzida na estampa) e separada da membrana nuclear pelo halo claro caracteristico; sobre a membrana nuclear, particulas de basichromatina tumefactas, semelhando depositos irregulares. Figura 9, cellula hepatica apparentemente normal do *M. rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII). Figuras 10 e 11, inclusões typicas (figuras em borboleta e em calota de esphera) no *M. rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII). O nucleolo não é visto na figura 10, provavelmente, em virtude do plano do corte; em 11, o nucleolo é formado por um granulo marginal vermelho escuro e uma porção restante menos intensamente corada.

ESTAMPA XXIX

As figuras 13 a 25 representam inclusões em *rhesus* inoculados com amostras brasileiras de virus, e as figuras 26 a 34, inclusões em *rhesus* injectados com a amostra africana Asibi.

Fig. 12, cellula hepatica do *rhesus* nº 13 C. Mn. inoculado com cultura de virus em meio de Noguchi (muitas passagens) e morto no 48º dia; nucleolo excentrico, reticulo de linina e particulas de basichromatina bem reconheciveis; no nucleoplasma não existe apparentemente oxychromatina.

Fig. 13, phase inicial de formação da inclusão no *rhesus* nº 8 Ar. (Quadro I); nella sobrevêm substancias acidophilas em dois pontos circumscriptos do nucleoplasma; o nucleolo, o reticulo de linina e a membrana nuclear, apparentemente integros.

Figuras 14 a 16 e 18 a 23, inclusões typicas no *rhesus*, Ar. Tx. (Quadro VII), macaco infectado por virus brasileiro transmittido por mosquitos; figuras em calota de esphera (15 e 16), em borboleta (18 e 20), tripartidas (19).

Nas figuras 15, 16, 18, 19 e 20, as particulas de basichromatina do reticulo de linina coram-se pela hematoxylina de modo nitido, quer no interior da inclusão, quer no halo claro que a circumda. Nas figuras 21, 22 e 23, as particulas de basichromatina não são mais bem apreciadas (com a ampliação usada, o que é attribuivel á lyse parcial que apresentam; em 22, ellas apparecem, sendo algum tanto tumefactas.

Figuras 17, 24 e 25, *rhesus* nº 8 Ar. (Quadro I) injectado directamente com sangue de doente, mostrando nitida tumefacção da basichromatina na membrana nuclear; em 24 e 25, as zonas onde existe a referida tumefacção alternam com outras onde apparentemente houve lyse completa da basichromatina depositada na membrana.

As figuras 27, 28, 32 e 33 pertencem ao *rhesus* 62 C. Mn. (Quadro VI); as 29, 30, 31 e 34, ao *rhesus* 58 C. Mn. (Quadro VI); a 26, ao *rhesus* 57 C. Mn. (Quadro VI).

As figs. 35, 36 e 40 representam cellulas epitheliaes da camada cortical das suprarenaes do *M. cynomolgus* 15 C. Mn. (Quadro III). Figura 35, nucleo normal; figura 36, cellula em dois nucleos, um dos quaes em karyolyse; figura 40, nucleoproteinas acidophilas accumuladas em ponto determinado do nucleoplasma e suggerindo uma inclusão da febre amarella.

As figuras 37 e 41 representam cellulas epitheliaes da camada cortical das suprarenaes do *rhesus* 8 C. Mn. (Quadro V); figura 41, alteração nuclear não especifica (basophilia do nucleoplasma) semelhante á que se vê em cellulas hepaticas de *rhesus*, quer injectados (figuras 42 a 47), quer não injectados «and also in man» (figura 55). As figuras 42, 46 e 47 provém do *rhesus* 24 C. Mn. (Quadro VII), as 44 e 45, do 8 C. Mn. (Quadro V), e a 43 do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII).

Figura 48 representa uma cellula hepatica do *rhesus* 2655 não inoculado, com o nucleo em pycnose.

Figura 49 representa uma cellula hepatica do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII) corada pela «Nuclealfärbung» de Feulgen; a inclusão não se cora, mostrando esboçado um reticulo, onde existem granulos em azul da Prussia vistos indistinctamente; sobre a membrana, porções coradas em violeta (chromatina).

Figura 38 representa um aspecto difficil de interpretar encontrado no figado do *rhesus* 443 Ar. (Quadro IV): artificio de preparação ? «empty nuclei» ?

Figura 39 representa uma cellula hepatica do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII); nucleolo vermelho, inclusão sem coloração.

Figuras 50 e 51 representam cellulas hepaticas do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII); a separação das porções componentes do nucleo é evidente.

Figura 52 representa uma cellula hepatica do *rhesus* 14 C. Mn. (Quadro V) com acidophilia do nucleoplasma, mas sem formação de inclusões.

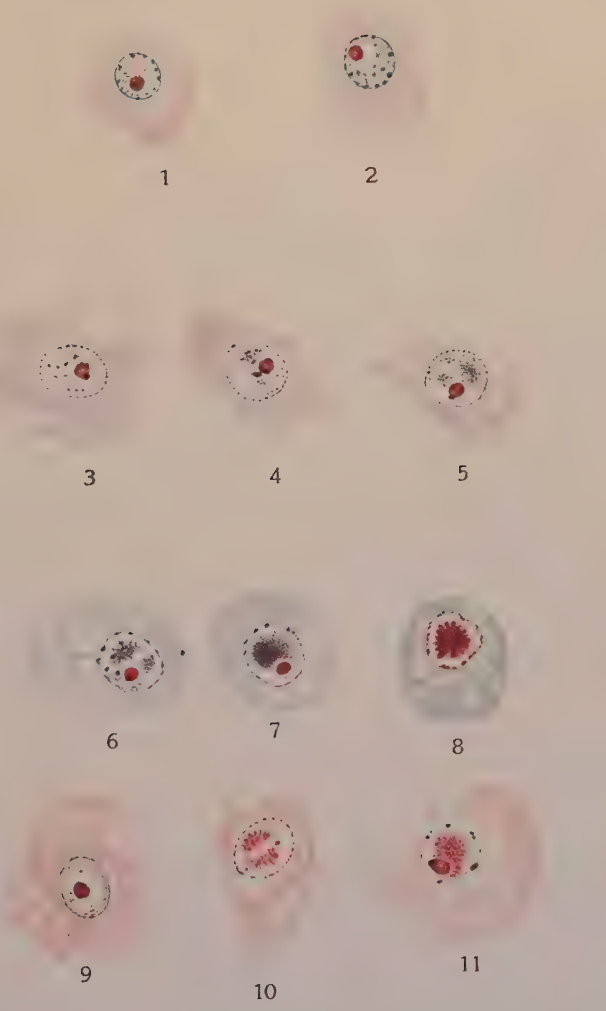
ESTAMPA XXX

Fig. 53 representa uma cellula hepatica com tumefacção do nucleolo em caso humano de febre amarella (caso 2488).

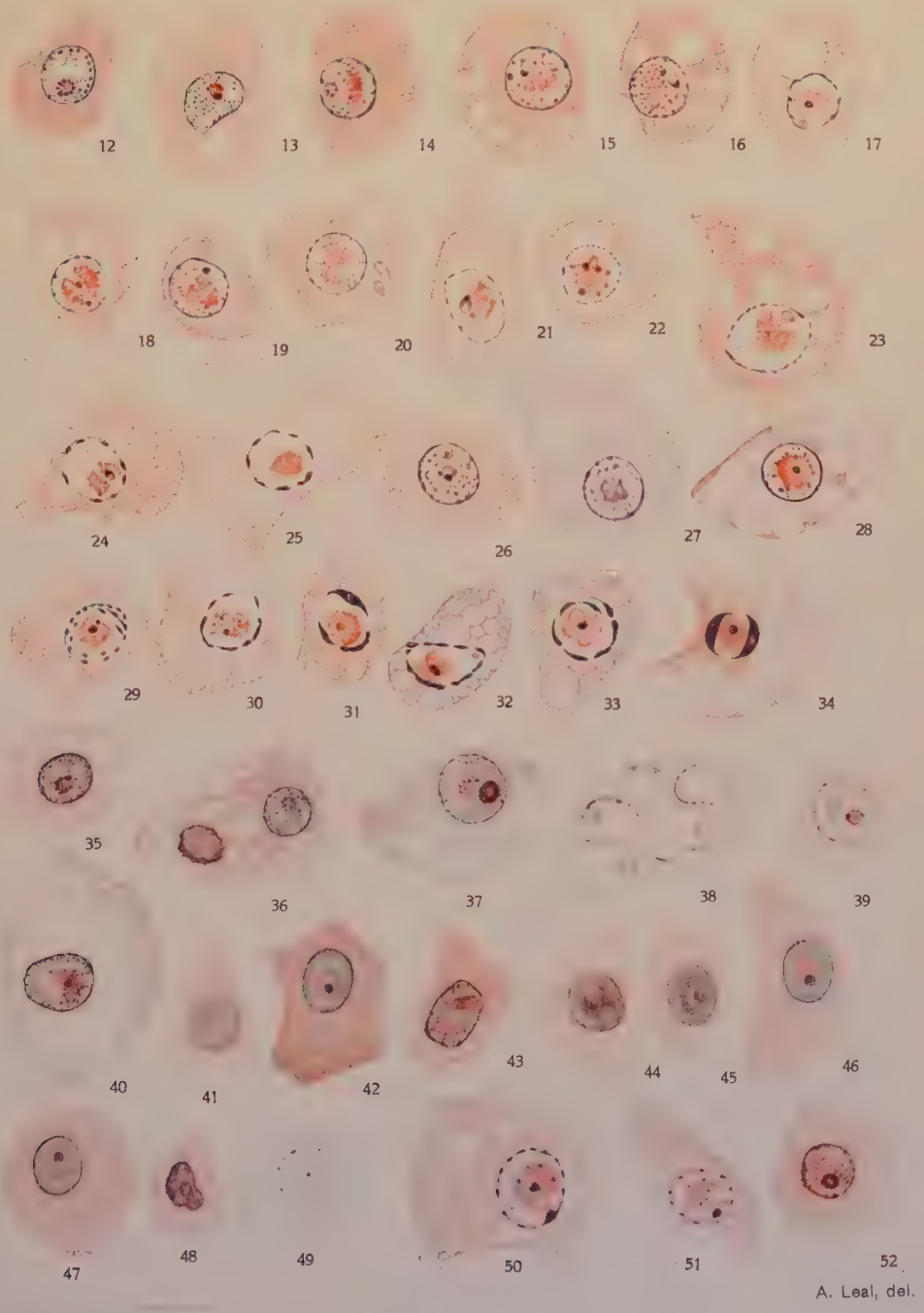
Figura 54 representa uma cellula hepatica com dois nucleos e multiplos nucleolos de tamanhos os mais variados, alguns micronucleolos com dimensões inferiores a 1/5 dos maiores; augmento de volume de um dos nucleolos (caso 5396).

Fig. 55 representa uma cellula hepatica com basiphilia do nucleoplasma em caso humano de febre amarella (caso 5406).

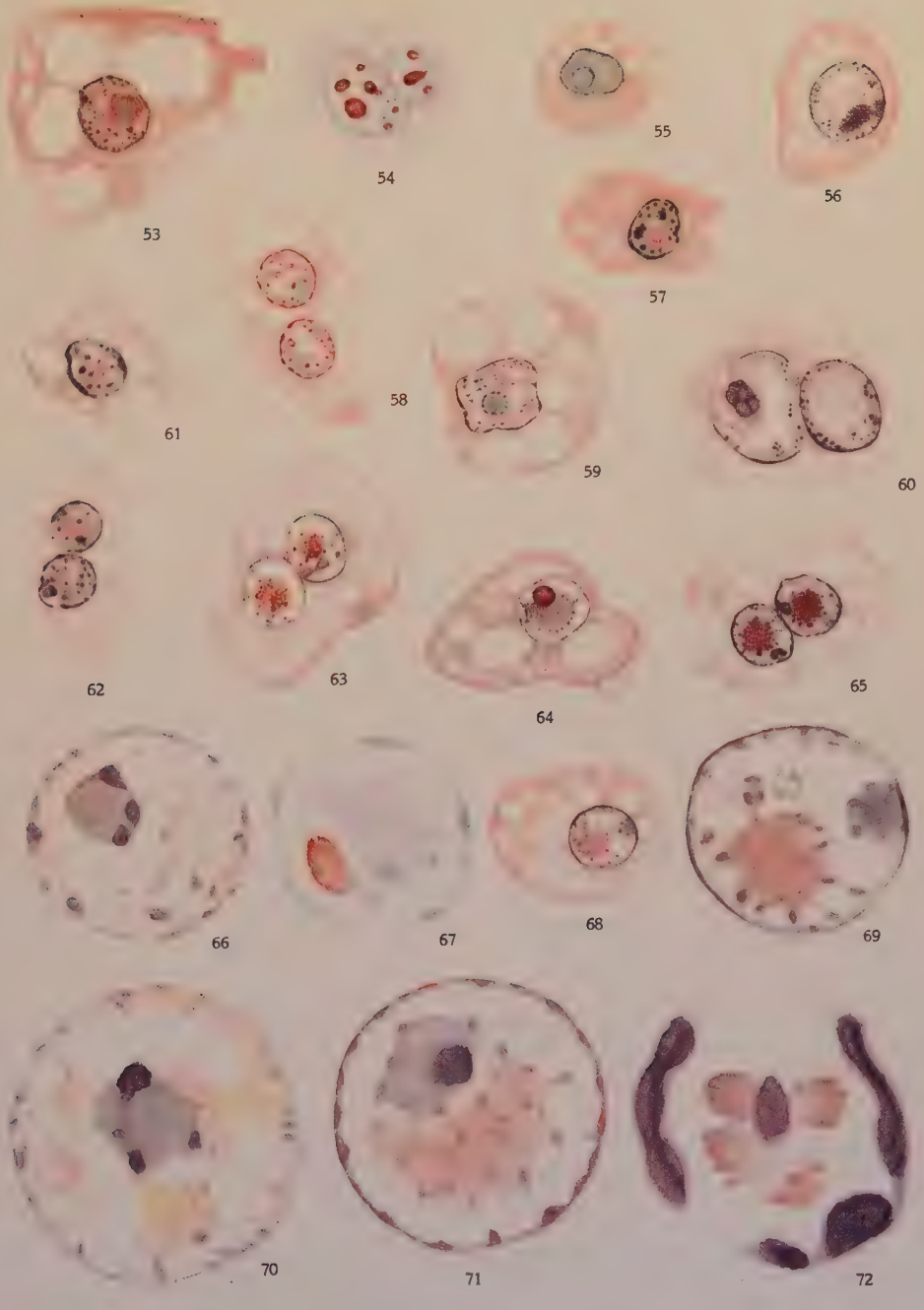
Fig. 56 representa uma cellula hepatica com alterações do nucleoplasma muito semelhantes ás inclusões nucleares das doenças de virus, encontrada em um caso de cancer da vesicula biliar (autopsia 2558); a conservação e integridade do reticulo de linina, a ausencia de tumefacção da basichromatina na membrana nuclear e do halo claro caracteristico em torno das porções acidophilas do nucleoplasma distinguem esse aspecto das inclusões especificas da febre amarella.



Dr. C. Magarinos Torres: Degeneração oxychromatica na febre amarella.
Oxychromatic degeneration in yellow fever.



Dr. C. Magarinos Torres : Degeneração oxychromatica na febre amarella.
Oxychromatic degeneration in yellow fever.



A. Leal, del.

Dr. C. Magarinos Torres : Degeneração oxychromatica na febre amarella.
Oxychromatic degeneration in yellow fever.

Figura 57 representa uma cellula hepatica de um caso de febre amarella (caso 2485) em cujo nucleo existe um granulo erythrocitiforme typico; o nucleolo não é reconhecivel no desenho.

Na figura 58 são vistos dois granulos erythrocytiformes em cada um dos nucleos de uma cellula hepatica de um caso de febre amarella (caso 2530).

Na figura 60, diversos granulos erythrocytiformes em «nucleos esvasiados» de uma cellula hepatica de caso humano de febre amarella (autopsia 5396).

Figura 59 representa uma cellula hepatica de caso humano de febre amarella (caso 5397) com multiplicidade de nucleolos e alterações do nucleoplasma semelhando inclusões.

Figuras 61 e 62 representam inclusões typicas em cellulas hepaticas de um caso humano de febre amarella (autopsia 2485); figuras 63, 64 e 65, em outro caso (autopsia 5271) e figuras 68 e 69, em outro (autopsia 5396).

A figura 69 representa o nucleo da cellula desenhada na figura 68, visto com maior ampliação; nella a inclusão é formada por uma substancia fundamental acidophila (oxychromatina e nucleoproteinas acidophilas formadas em condições anormaes ?) e por um stroma; este é o proprio reticulo de linina e as particulas de basichromatina nelle inclusas; estas soffrem lyse parcial.

Figura 66 representa o nucleo de uma cellula hepatica apparentemente normal, no *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII); a oxychromatina existe em quantidade discreta.

Figura 70 mostra o nucleo de uma cellula hepatica do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII) em phase inicial de formação das inclusões; a albumina acidophila, corada de modo desigual em roseo e roseo-alaranjado, está alojada nas malhas do reticulo de linina, em 4 pontos separados entre si.

Figura 71 mostra uma inclusão typica na cellula hepatica do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII); a estructura do stroma é bem reconhecivel no interior da inclusão e bem apreciada a sua continuidade com o reticulo de linina no espaço claro que circumda a inclusão.

Na figura 67 é tambem, apparente o stroma da inclusão em continuidade com o reticulo de linina bem conservado, fóra da inclusão; cellula hepatica do *rhesus* Ar. Tx. (Quadro VII).

Fig. 72 mostra uma inclusão typica na cellula hepatica do *rhesus* 58 C. Mn. (Quadro VI) em phase adiantada de ormação. Na inclusão nota-se a substancia fundamental mostrando variações no colorido roseo de um para outro ponto, e o stroma. O stroma é formado pelo reticulo de linina com malhas estreitas e deformadas, e particulas de basichromatina levemente tumefactas e em lyse. Pronunciada tumefacção da basichromatina na membrana nuclear.

Oxychromatic degeneration ("intranuclear inclusions") in yellow fever (*)

by

C. MAGARINOS TORRES

(With plates XXVIII—XXX)

The discovery of Stokes, Bauer and Hudson (1928) of a sure procedure of reproducing yellow fever in laboratory animals really marked a decisive stage in the knowledge of this disease.

In the first place considerable support was given to the view that yellow fever is a filtrable virus disease.

It is not our aim to deal with the work on aetiology of yellow fever posterior to the studies of Stokes, Bauer and Hudson. We will only mention some of the names among the most prominent in this field, namely those of Aragão, Sellards and Hindle, Cunha and Muniz, Petit, Stefanoupulo and Frasey, Davis, Sawyer, Lloyd, Kitchen, Frobisher, etc.

The conception of yellow fever as a virus disease being reestablished on new bases, a great problem then presented itself in the morphologic ground. It was to know whether yellow fever was able to produce peculiar intracellular bodies like those recognised in rabies, vaccinia virus, *herpes febrilis,* small pox, contagious epithelioma (fowl-pox) of chickens, etc.

Having this point in view we have settled with great interest the study of tissues from *Macacus rhesus* monkeys injected with yellow fever virus isolated by H. de Beaurepaire Aragão from human cases during 1928 yellow fever epidemy at Rio de Janeiro, Brazil.

In two communications made to the Société Brésilienne de Biologie in June 24th and July 29th, 1928, we have announced the discovery of characteristic intranuclear inclusions in a *Macacus rhesus* monkey dying five days after inoculation with blood of a yellow fever patient.

In the first note published in *Comptes rendus de la Société de Biologie* we stated:

«La présence, dans le noyau des cellules du foie, d'inclusions acidophiles de même nature que celles qui ont été signalées das l'herpès simplex, l'herpès symptomatique, la varicelle et le virus III du lapin, et décrites, parfois, sous le nom de dégénérescence oxychromatique». (Torres, 1928a).

(*) Received for publication 11 June, 1930.

In notes to the Société Brésilienne de Biologie on August 15th and 29th and September 14th and 26th, 1928, we have reported the hyperplasia of the nuclei attained by oxychromatic degeneration, the distinction between intranuclear inclusions and non specific early necrobiotic changes (Torres 1928 b), the presence of oxychromatic degeneration in *Macacus cynomolgus,* its absence in uninoculated monkeys (Torres, 1928 c), the frequency of oxychromatic degeneration in monkeys injected with Brazilian strains examined between the 6th and 10th days after inoculation and their gradual decrease in later stages of the disease (Torres 1928d), the diagnostic importance of intranuclear inclusions in monkeys in which the typical histopathological changes described by Stokes, Bauer and Hudson were missing (Torres 1928h).

On September, 8th, 1928 we write:

«Our results suggest the believe that yellow fever is a filterable virus disease in which typical inclusions are found only inside the nucleus (acidophilic intranuclear inclusions) as is the case with herpès zoster, symptomatic herpès, varicella and virus III infection of rabbits». (Torres, 1928f).

A summary of these notes is given in «Sciencia Medica» (Torres 1928e) and «Memorias do Instituto Oswaldo Cruz» (Torres 1928i).

Hudson, in three papers published in October 1928, reports the macroscopic, microscopic and comparative pathology of experimental yellow fever based upon the examination of sixty-eight *M. rhesus* monkeys injected with the African strain Asibi of yellow fever virus.

The nuclear changes of the liver cells are described as follows:

«Nuclear changes coincide with the changes of the cytoplasm. Large, poorly stained, vesicular nuclei with prominent nucleoli are found in the necrobiotic liver cells. In such nuclei, minute, dull red granules are often found. They were present in half the thirty specimens studied; in an additional six specimens, this type of nuclear change is less often present. Occurring in half the livers of this group, variable numbers of nuclei appear as small, round, intensely acidophilic dots. This form of degeneration is usually seen in the comparatively rare, small liver cell having smooth, intensely stained cytoplasm. The nucleus finally disappears in advanced necrotic cells either by lysis or karyorrhexis. In eleven specimens, karyorrhexis is common or marked, while in five others it occurs relatively infrequently. When karyorrhexis is marked, scattered nuclear débris is conspicuous in the hepatic cells throughout the section. Mitosis is not found». (Hudson, 1928b).

This description does not differ essentially from that given in the first paper of Stokes, Bauer and Hudson as one can see from the following quotation:

«The extent of necrosis varied from a definitely limited midzone to a wide band of altered cells leaving only a fringe of non-necrotic cells about the portal area and central vein; sometimes even the central cells were acidophilic and granular. Necrosis of either the periportal or central areas alone was found in no specimen. The nuclei of the degenerated cells varied from being completely absent Karyorrhexis was a common finding, and often the nuclei were small, round, and intensely eosinophilic. In some specimens the nuclei of altered cells contained peculiar small acidophilic granules. Mitotic figures were not seen». (Stokes, Bauer e Hudson, 1928).

On December, 26th, 1928 we write that negative Feulgen's nucleal reaction and staining by fuchsin R. Loeffer's methylene blue shows that intranuclear inclusions have a different composition from that of chromatin and nucleolus. By the Goodpasture procedure the nucleoli are stained red and the inclusions blue violet:

«Dans les noyaux ou celles-ci sont peu abondantes et divisées en deux ou trois corpuscules (stades initiaux), cette méthode révèle une structure réticulaire très nette de ces corpuscules (inclusions nucléaires). Lorsque, dans la même préparation, on examine aussi les noyaux sans inclusions, on est tenté d'interpréter ces formations comme résultant d'une coagulation ou précipitation du nucleoplasme, l'acidophilie et la structure réticulaire des inclusions étant plutôt des arguments favorables à cette interprétation». (Torres, 1928 j).

On March 1929, we report differences in the appearance of intranuclear inclusions in monkeys injected in one side with Brazilian strains, in the other with Asibi strain. We have explained them on the basis of diversity in virulence and adaptation of the virus to the injected monkey. In a coloured plate we represent the nucleolus preserved even at final stages of oxychromatic degeneration and topographically distinct of the intranuclear inclusions (Torres, 1929 a).

Cowdry and Kitchen, on the 1st of March, 1929 report the presence of intranuclear inclusions:

«Which bear a striking resemblance to those of Torres, in the liver cells of eight *Macacus rhesus* monkeys infected with the West African virus of yellow fever. They also occur, though less abundantly, in the suprarenal gland. «Verificaram que» the inclusions are present as such in the living animal and do not in any sense represent the coagulating action of the fixative».

What was more important, they said:

«Intranuclear inclusions like those seen in the monkey tissues were found in 22 of the total of 25 «human cases of yellow fever examined». Cowdry & Kitchen, 1929).

On March, 9th, 1929, Hindle says:

«The oxychromatic changes in the nucleus result in the formation of acidophilic intranuclear bodies which Torres (1928) considers to be equivalent of those occurring in other diseases caused by filterable viruses such as herpès, Virus III, etc.». (Hindle, 1929a).

On March, 27th, 1929, we report the relation between the stage of the disease, the strain of virus employed and intranuclear inclusions. They were absent in monkeys inoculated with Brazilian strains and examined 3 and sometimes even 5, 6 and 8 days after the inoculation. On the contrary, they were constantly found and usually quite numerous in *M. rhesus* monkeys injected with the West African virus of yellow fever examined 3, 4, 5, 6, 7 and 9 days after the inoculation. (Torres, 1929 b).

On April 6th, 1929, we refer the presence of acidophilic intranuclear inclusions in a human case of yellow fever dying 40 hours after the appearance of the first symptoms:

«As recentes verificações vem estabelecer de modo definitivo que a febre amarella, sendo uma doença produzida por um virus filtravel deve ser collocada no «karyo-vikon group» da classificação de Lipschütz». (Torres, 1929c).

Hoffmann, writes in Band III, 1929, of Kolle, Kraus and Uhlenhuth's Handbuch der pathogenen Mikroorganismen:

«Magarinos Torres hat von kurzem in Rio in der Leber gelbfieberkranker Affen Veränderungen an den Zellkernen gefunden, die denen ähnlich sind, die bei Herpès zoster, Varizellen und verwandten Krankheiten auftreten und unter dem Namen der «acidophilen intranuclearen Inklusionen» oder auch als «oxychromatische Degeneration» beschrieben sind»... «Uber das Vorkommen solcher Einschlüsse in der Leber des Gelbfieberkranken Menschen ist noch nichts veröffentlicht. Ich habe meine sehr gut gefärbten Schnitte von zahlreichen Gelbfieberfällen daraufhin genau durchgemustert, aber nur in einem Fall offenbar die gleichen fremden Einschlüsse in den Kernen der Leberzellen feststellen können». (Hoffmann, 1929a).

On April and June, 1929, we have published figures of intranuclear inclusions in monkeys injected with Brazilian and African strains (Torres, 1929 d) and in man (Torres, 1929 e).

Hindle, in May, 1929, in a discussion on ultramicroscopic viruses, says:

«It may be argued that yellow fever is not due to a filterable virus, but it falls into line with most of the others. You get the same eosinophilic inclusions and also it is filterable...» (Hindle, 1929b).

On June, 1929, we have published figures of nucleolar changes in hepatic cells from human cases of yellow fever and have called the attention to such changes as a pitfall in the diagnosis of specific intranclear bodies in human cases. It may be clearly seen either from the figures or from the accompanying description that intranuclear granules of nucleolar origin may simulate intranuclear inclusions in sections stained by phloxin red (Torres, 1928 f).

Hindle and Stevenson, on June 25th, 1929, refer the demonstration of oxychromatic intranuclear inclusions in liver sections of a human case of yellow fever and of an infected *M. rhesus* monkey (Hindle and Stevenson, 1929).

Penna and Figueiredo, on July 15th, 1929, report the presence of intranuclear inclusions in 12 livers of monkeys infected with yellow fever virus (Penna e Figueiredo, 1929).

Hoffmann, in August, 1929, have published a paper on: «Einschlüsse in den Leberkernen beim menschlichen Gelbfieber» with the following summary:

«In einem menschlichen Gelbfieberfall aus Westafrika wurden die Einchlüsse in den Kernen der Leberzellen nachgewiesen, die von M. Torres bei Gelbfieber affen beschrieben sind. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Einschlüssen um einen Entartungsvorgang des Kernes, aber es bleibt noch zu erforschen ob der Ereger des Gelbfiebers für ihre Entstehung mit verantwortlich, vielleicht auch in ihnen versteckt ist». (Hoffmann, 1929b).

Pettit, on October 1929, wrote:

«Ces faits de structure se retrouvent dans les préparations de foies prélevés sur les *Macacus rhesus* morts de fièvre jaune et je ne puis que confirmer la parfaite exactitude des constatations de C. Torres. Toutefois, on notera que le processus, actuellement désigné sous le nom de dégénérescence oxychromatique, a été observé sous d'autres appellations par les histo-pathologistes en de nombreuses conditions pathologiques. Je l'ai signalé dans le foie d'animaux morts de trypanosomiasis...» (Pelit, 1929).

Hoffmann, on March 1930 says:

«Last year C. Magarinos Torres of the Oswaldo Cruz Institute in Rio found certain inclusion bodies in the nuclei of the liver cells of Rhesus monkeys experimentally infected with yellow fever. Through his kindness I had the opportunity to see his preparations and when I studied the sections which I have of numerous human cases, I shaw the same inclusions, though only in a few cases and in small numbers. But in one of them, a case from West Africa, they were as numerous as they are found in the liver of the monkeys, or in almost all the cells which are not attacked by the typical fatty or necrotic degeneration» (Hoffmann, 1930).

Cowdry and Kitchen published, on March, 1930, a full account of their researches on intranuclear inclusions in yellow fever. The direct comparison of the latter with those produced by the virus of herpes in the liver of a *Cebus hypoleucus* monkey, the indirect comparison with those caused by virus III disease, the submaxillary virus, and the viruses of vesicular stomatitis, chicken pox and Borna disease, the study of staining reactions of nuclei in liver cells of infected monkeys, the description and microchemical reactions of the inclusions in the living state and a careful description of the intranuclear inclusions in stained sections are some of the more interesting results refered in that important paper. (Cowdry and Kitchen, 1930).

Finally, Theiler, on April, 1930, announcing the susceptibility of white mice to the virus of yellow fever, refers the presence of intranuclear acidophilic inclusions in ganglion cells. (Theiler, 1930).

MATERIAL AND TECHNIC

The material examined consisted:

1°—of tissues, in many cases only the liver from one hundred and eighteen *Macacus rhesus* monkeys, from three *M. cynomolgus* monkeys and from one *M. speciosus* monkey inoculated with yellow fever virus. Eightytwo *M. rhesus* monkeys were injected with the West African strain «Asibi»; thirty-six *M. rhesus* monkeys, three *M. cynomolgus* monkeys and one *M. speciosus* monkey with South-American strains; in nineteen *M. rhesus* monkeys and two *M. cynomolgus* the strain of virus inoculated was the F. W. Brazilian strain. The original sources of the African strain «Asibi» is described by Sawyer, Lloyd and Kitchen (1929) and that of the South American strains by Davis and Burke (1929).

2°—of tissues from seventeen human cases of yellow fever whose autopsies were performed during the epidemy of 1928 at Rio de Janeiro, Brazil.

3°—of tissues, specially the liver from seven uninoculated *M. rhesus* monkeys.

4°—of tissues, specially the liver from thirteen *M. rhesus* monkeys injected with miscellaneous material, viz., liver from yellow fever patient, Noguchi's medium inoculated with virus (several passages), *Bacillus typhosus* culture, material from parietal thromboendocarditis, etc.

5°—of liver from seven *Saimiri sciureus* monkeys injected with yellow fever virus.

6°—of liver from one phosphorus empoisoned dog, from several

dogs injected with *Shizotrypanum cruzi*, and from a guinea-pig intoxicated by carbontetrachlorid.

7º—of tissues from four *Pseudocebus azarae* monkeys and five rabbits inoculated with yellow fever virus.

Most of the experimental material was obtained through the courtesy of Dr. Carlos Chagas, Dr. H. de Beaurepaire Aragão, Dr. A. Marques da Cunha, Dr. J. Muniz, Dr. J. da Costa Cruz and Dr. J. Teixeira.

The autopsies were personally performed by us and sometimes in circumstances specially favorable for an histopathological study. In four cases, indeed, the section was initiated twenty-three, thirty, forty minutes and one hour and ten minutes after death. In most cases detailed clinical records and sure informations about the day of the disease in which death had occurred could be afforded. We are indebted to the clinical staff of Oswaldo Cruz Hospital, Rio de Janeiro, Dr. E. Chagas, Dr. A. Lobo and Dr. J. Teixeira for the facilities which were made available.

Several standard fixations were employed of which the following may be mentioned: Zenker's fluid with the usual 5 per cent of acetic acid, formalin-Zenker, Regaud's mixture, Schaudinn's sublimate-alcool and 10 per cent aqueous formalin solution. In our experience there is not any conspicuous modification in the structure of the intranuclear corpuscles referable to the fixative employed. Of course, in tissues fixed in formalin used alone it was difficult to secure an intense coloration by eosin and phloxin red of the intranuclear inclusions as well as of any other acidophilic cellular constituent. This was particularly the case when tissues were kept for a long time in the formalin solution. This objection is much lessened when the tissues are allowed to remain only for a few hours in the formalin solution.

The majority of our tissues were fixed in Helly's or Zenker's fluid and formalin, two of these fixatives being used as a routine work in each case.

Desparafined sections were stained with Delafield's hematoxylin and eosin, Meyer's hemalaun and eosin, bordo and Meyer's hemalaun, Unna's polychromic blue, Feulgen's «Nuclealfärbung», Pappenheim-Unna's carbolmethylgrün-pyronin, phloxin red and Unna's alkaline methylene blue solution, phloxin red and toluidin blue, basic fuchsin and Löffler's methylene blue and by Giemsa's method.

Records of controls are given. They are *M. rhesus* monkeys not inoculated in Oswaldo Cruz Institute either with yellow fever virus or with any other material. The specimens were appropriately lodged and fed since they arrived at the Institute. Notwithstanding, the mortality was

rather high in some shipment of monkeys and specimens showed evidence of malnutrition and inadequate care.

The records reproduced afford some interest in account of peculiar nuclear changes (figs. 42, 43, 44, 45, 46 and 47) previously reported by us as «necrobiotic (non specific) nuclear changes» and as «early stages in necrobiosis of liver cells»:

«Which were observed in injected, as well as in uninoculated animals. Special reference to them is made here on account of the presence inside the nucleus of eosin-staining substances». (Torres, 1929a).

They were a common finding in *rhesus* 2618, and were present also in *rhesus* 2655.

Later on Cowdry and Kitchen have found same alterations in one case of avitaminosis. They write:

«It is possible that the changes in some of Torres animals resulted in some way from tthe action of the yellow fever virus, for he does not make clear, which of the experimental procedures mentioned called them forth» (Cowdry and Kitchen, 1930).

The data here given lead us to conclude that in our material such peculiar nuclear changes have no direct relation with the yellow fever virus. All the monkeys comming directly from abroad were at ounce stored in mosquito-proof cages inside a mosquito-proof room with screaned doors (Drs. Aragão and Cunha-Muniz laboratories).

It is a matter of fact that we have found similar nuclear changes likewise, in injected *rhesus* monkeys nº 24 C. Mn. (Table VII, figs. 42, 46 and 47), dying early and without symptoms, nº 8 C. Mn. (Table V, figs. 44 and 45), and *M. rhesus* Ar. Tx. (Table VII, fig. 43).

Rhesus monkey 2504 (June 24th, 1928)—Imported by the Rockefeller Foundation in Brazil. Died before inoculation (Dr. Aragão's laboratory). At necropsy, adult (old ?), female specimen, weighing 2250 grs., measuring 16 cms. from head to root of the tail, and 62 cms. from head to tip of the tail.

Weights and dimensions:

Liver	105 grs.	
Spleen	4 grs.	measuring 4 × 2 × 1,5 mms.
Right kidney	12,5 grs.	measuring 4 × 2.7 × 2 mms.
Left kidney	11 grs.	measuring 4 × 2,5 × 2 mms.

The liver reaches 5 mms. below the costal border. In the peritoneum, 13 c.c. of a limpid, light yellow fluid. In the pericardium, about 5 c.c. of clear fluid. Left axillary lymph-node measuring 12 mms. in its larger diameter.

Anatomic diagnosis: Chronic ulcerative tuberculosis of left lung. Left tuberculous pleurisy. Peri-bronchial caseous lymphadenitis. Acute miliary tuberculosis of right lung, liver, kidneys and bonemarrow. Specimens of *Oesophagostomum* (according to Prof. L. Travassos) in the large intestine. Material fixed in Zenker's fluid with acetic acid.

Microscopic examination: Liver sections show congestion, slight fatty degeneration of hepatic cells and scattered focal necrosis (caseification) with extensive cellular exsudation. There is no formation of typical tuberculous follicles. Except in the necrotic areas, the hepatic cells nuclei are rather normal in appearance. Oxychromatic degeneration is not seen.

Rhesus monkey 2599 (August 2-nd, 1928): Died before inoculation, possibly from cold (Dr. Aragão's laboratory). At autopsy, no visible macroscopic lesions. Liver sections show extensive fatty degeneration around the portal veins and necrosis of hepatic cells. Necrosis is recognised by eosinophilia of the cytoplasm and karyolysis of the nuclei which, however are not obviously diminished in size. There are, moreover, congestion and small hemorrhages. Small collections of polymorphonuclear are wanting. No oxychromatic degeneration in hepatic cells.

Rhesus monkey 2614 (August 5th, 1928): Died before inoculation (Drs. Cunha and Muniz laboratory). At necropsy, poorly nourished specimen showing many parasitic nodules in lungs and large intestine; in liver, there is a solitary, circumscribed nodule containing a cestode worm as well as extensive fatty degeneration. There are in no organ lesions suggestive of tuberculosis. Liver sections show congestion and extensive periportal fatty degeneration. There is neither oxychromatic degeneration nor conspicuous necrosis of hepatic cells.

Rhesus monkey 2618 (August 10th, 1928): Not injected. Spontaneous death (Dr. Aragão's laboratory). At necropsy, young, well-nourished, female specimen, measuring 36 cms. from head to root of the tail, weighing 1.400 grs. *Conjunctivae* clear, *superficial lymphatic glands* not enlarged, parietal *peritoneum* smooth, moist and glittering. Both *lungs* retracted, right lung adherent by rather firm adhesions to the diaphragm. On palpation there are no nodules and both lungs are crepitant. *Peribronchial lymphnodes* not enlarged. Heart appears normal; right cavities distended by blood coagula. *Spleen* small, firm, measuring 27 × 15 × 7 mms.

The capsule is thin. Cut surface is dry and grayish red in colour. Lymphoid elements are visible but not prominent. *Liver* enlarged, measuring 85 × 48 × 38 mms. Capsule thin. Cut surface deep violet in colour exsuding some bloody fluid; the «nutmeg liver» is roughdrawn. *Kidneys* normal in size. Left kidney measures 28 × 18 × 15 mms.; right kidney, 28 × 18 × 15 mms. On cut section the pale yellow cortex is somewhat enlarged and swollen. The surface of large intestine shows several dark grayish nodules irregularly scattered.

Weights:

Left lung	5 grs.
Left kidney	4 grs.
Spleen	2 grs.
Heart	9 grs.,5
Right lung	5 grs.,5
Right kidney	4 grs.
Liver	62 grs.

Anatomic diagnosis: Parasitic nodules in the large intestine. Congestion and fatty degeneration of liver. Degeneration of kidneys. Right chronic fibrous adhesive pleuritis.

Microscopic examination: Liver sections show chronic passive congestion and extensive periportal fatty degeneration. No conspicuous necrosis of liver cells, viz., no round-shaped, isolated hepatic cells with strong acidophilic cytoplasm are to be found. Nevertheless quite numerous hepatic cells are found whose nuclei present a diffuse blue stained nucleoplasm and shows apparent lysis of intranuclear basichromatin as well as eosin-staining intranuclear substances and peculiar nucleolar changes. The nuclear aspects are similar to those represented in figs. 42 to 47.

Rhesus monkey 2638 (August 16th, 1928): Not infected. Found dead on morning (Drs. Cunha and Muniz laboratory). At necropsy, (performed at 14 o'clock), rather poorly nourished young female specimen, measuring 33 cms., 5 from head to root of the tail, weighing 860 grs. Teeth small and well preserved. On body section, the subcutaneous fat is greatly reduced, almost disappeared. Peritoneum smooth and glittering. *Lungs* retracted and free from adhesions. In the upper lobe and in the upper part of the inferior lobe of left lung, there are found 5 or 6 small, prominent, circumscribed, yellowish parasitic nodules. Similar nodules do exist at the surface of the inferior lobe of right lung. On section the cut surface is dry and pink in colour; no areas of consolidation. *Peribronchial lymphnodes* not enlarged. Firm coagula, grayish red in color inside the

heart cavities. Spleen measures 30 × 15 × 6 mms. The cut section is dry, pale grayish red in colour, the lymphoid elements are small and hardly seen, the intersticial ones seems normal. Left kidney measures 26 × 15 × 12 mms. and the right, 26 × 16 × 12 mms. In both kidneys the cut section is grayish red in colour and the cortex is somewhat swollen. Intima of thoracic aorta smooth and slightly yellow. *Mesenteric lymphnodes* in the shape and size of grains of rice. *Liver* a dark grayish red in colour with violaceous spots. The cut surface is moist exsuding some blood and presents the same colour. The fat content is not apparently increased.

Weights:

Left lung	2 grs.
Left kidney	2 grs.
Spleen	1 gr.
Heart	3 grs.
Right lung	2 grs.
Right kidney	2 grs.
Liver	31 grs.

Anatomic diagnosis: Congestion of liver. Degeneration of kidneys. Parasitic nodules (numerous) in both lungs. Cachexia (malnutrition ?).

Microscopic examination: Liver sections show extensive congestion. There is neither fatty degeneration, nor oxychromatic degeneration and conspicuous necrosis in hepatic cells.

Rhesus monkey 2655 (August 22nd, 1928): Not injected. Found dead on morning (Drs. Cunha and Muniz Laboratory). At necropsy, (performed at 14 o'clock), small, poorly nourished male specimen weighing 1200 grs., measuring 37 cms., 5 from head to root of the tail. Both *lungs* show neither tuberculosis and bronchopneumonia nor parasitic nodules and chronic fibrous pleuritis. Dark red coagula inside the heart and dilatation of right auricle. No hemorrhages, either on serous membranes or in pulmonary parenchyma. Parasitic nodules in walls of *large intestine*. *Spleen* measures 35 × 16 × 7 mms. *Liver* dark grayish red in colour with an extensive violaceous spot at antero-superior surface. The cut surface shows chronic passive congestion. Right *kidney* measures 28 × 18 × 13 mms.

Weights:

Left lung	5 grs.
Left kidney	5 grs.

Spleen	2 grs.
Heart (without clots):	7 grs.
Right lung	5 grs.
Right kidney	5 grs.
Liver	38 grs.

Anatomic diagnosis: Chronic passive congestion and fatty degeneration of liver. Parasitic nodules in walls of large intestine. Malnutrition (?).

Microscopic examination: Liver sections show congestion and extensive periportal fatty degeneration. The arrangement of hepatic cords is modified: in many places there appear isolated cells as if they were dissociated. Necrosis of hepatic cells is recognised by pycnosis of nuclei (extensive) and acidophilia of cytoplasm. Some cells show peculiar nuclear changes, presenting a blue stained nucleoplasm and chromatolysis. No hepatic cells present oxychromatic degeneration.

MORPHOLOGY OF INCLUSIONS IN INFECTED MONKEYS

Cowdry remarks that the term «inclusion body» has no descriptive value and is perhaps unfortunate because it conveys the impression that the structures so designated are in some way «included», and the designation «x-body» employed by botanists would, in his opinion, be preferable until we learn more of their nature (Cowdry, 1928).

It is generally admitted that such «x-bodies» represent at least in part, «reaction products» made up by the cell in response to injury. Goodpasture (1925, b) concludes that in the rabbit the «lyssa bodies» and Negri's bodies result in part from alterations of the neuro-fibrils and chondrioma of the nerve cell.

> In yellow fever, it seems evident that the material which constitutes the yellow fever «inclusions» may partially at least be composed of coagulated nucleoplasm, being surely of a different structure and composition from the two nuclear constituents, chromatin and nucleolus» (Torres, 1929a).

Though in our opinion intranuclear inclusions in yellow fever are simply a specific retrograde process in the nuclei of liver cells, the term «inclusion» will be frequently employed for the sake of brevity.

We have studied yellow fever inclusions only in fixed and stained sections so that we have to consider, in our description, a network (the «linin» of the older histologists) as well as basichromatin, oxychromatin, etc.

Thus, since Cowdry and Kitchen (1929 and 1930) have recognised that the inclusions do exist as such in the living liver cell and do not represent an artefact due to the fixative, the study of stained sections shows that if they now represent an artefact, this latter presents fairly constant characteristics which are worth consideration.

Reference to the normal nucleus of hepatic cells in sections stained with the same method used in the study of the inclusions is always desirable since its appearance is somewhat different according to the kind of the animal and even the staining method employed.

Thus, in the *Hapale penicillata* monkey, in the dog and in the chicken, oxychromatin is fairly conspicuous in the nuclei of liver cells stained with hematoxylin and eosin. In *Macacus rhesus* monkey, however, oxychromatin is rather scarce and not always seen in sections stained with hematoxylin and eosin (fig. 12). It is more easily put in evidence when sections are stained with phloxine red and toluidine blue (fig. 66). It may be that oxychromatin varies in amount in normal nuclei from animal to animal and perhaps according to the age of the specimen.

«Indeed, «Buehler», étudiant la chromaticité des noyaux dans les cellules nerveuses, a vu que les jeunes cellules des embryons ont un noyau riche en basichromatine, que l'oxychromatine y parait ensuite et augmente de quantité avec l'âge» (Prenant, Bouin et Maillard, 1904).

Shape and dimensions of the nuclei in liver sections are at variance according to the plan of sectioning.

Most nuclei are slightly oval in shap (fig. 12), others are round (figs 1 and 2). Measuring ten liver cells observed in differents fields of the same section we found:

nucleus	I	10 × 6 μ
»	II	9 × 6,5 μ
»	III	9 × 6,5 μ
»	IV	9 × 6 μ
»	V	9 × 6 μ
»	VI	8 × 6 μ
»	VII	8 × 5 μ
»	VIII	7 × 5,5 μ
»	IX	7 × 5 μ
»	X	5 × 5 μ

In sections stained with phloxine red and toluidine blue, the nuclear membrane is stained a deep blue with particles of basichromatin attached to it; not rarely one particle is somewhat larger than the other (fig. 66).

The linin network stains a light violet and is attached to the nuclear membrane. It presents particles of basichromatin, more deeply stained in violet, regularly scattered over the network and apparently laying in the intersection points of the network (fig. 66). The meshes of the linin network are rather regular in its dimensions.

In almost every nucleus some larger particles of basichromatin are to be seen nearer the membrane than the central portion (figs. 1, 2 and 12). The others smaller particles present an irregular shape and their size is also fairly uniform. (figs. 2 and 66).

Oxychromatin forms homogeneous masses of rather indistinct contours presenting variable intensity of staining with «acid» dyes in the same nucleus (fig. 66). It is generally most apparent near the nuclear membrane and the nucleolus.

Oxychromatin is also found in an intermediate zone between nucleolus and nuclear membrane and often presents a distinct granular aspect or the appearance of acidophilic filaments when the section is examined with Oc. 4× and Obj. imm. 1/12 Leitz.

Those aspects, however are modified when the sections are examined with a periplan. Oc. 25 and Obj. 1/12 imm. homog. Leitz, manoeuvring the diaphragm-iris and using as illuminating apparatus the white light of Leitz' «Spezial-lampe» 6 Volt 5 Amp. «Nitra».

In the optical conditions just refered, it may be seen that the «granules» corresponds to a more or less irregular area of oxychromatin filling up one or more meshes of the linin network (fig. 66). As regards the filaments, they are but portions of the linin network at whose immediate vicinity a narrow deposit of oxychromatin is condensed.

In resume, when examined with a magnification of 600—1000 diameters, the nuclei of normal liver cells of *rhesus* monkeys presents sometimes acidophilic granules as well as acidophilic filaments. Examination in other optical conditions shows, however, that they are not really granules nor filaments but a deep hink stained substance in most cases lying on the meshes of the linin network or around portions of the network. Nucleoplasm out of the places where oxychromatin appears, is clear and apparently without structure.

The nucleolus is generally single and excentric (Figs. 1, 2, 12 and 66). In sections stained with phloxin red and toluidin blue it shows a sligh-

tly irregular shape and is formed by two distinct substances (fig. 66), one of which, stained a deep blue almost black form two or three irregular granules one of which, as a rule, is more voluminous than the other, or a narrow band marginating the nucleolus. The remaining and larger portion of the nucleolus stains faintly and homogeneously a beautiful Prussia-blue colour (figs. 50 and 51).

The first change in development of yellow fever inclusions is the appearance simultaneously in two, three or more places of nucleoplasm (figs. 4, 5, 13, 19, 26, 27 and 70) within the meshes of the linin network of a basic nucleoprotein stained carmine with bordo and pink with eosin and phloxin red. In the early stages this nucleoprotein corresponds in all probability to an increase in the oxychromatin content of the nucleus; in latter stages, however, the increase becames very considerable and it is probable that other acidophilic nucleoproteins not visible within the normal nucleus, became apparent and contribute to form the new intranuclear albumin. It seems probable therefore, that the acidophilic intranuclear substance which forms the yellow fever inclusion is not a single nucleoprotein but a complex of nucleoproteins formed in nucleoplasm under abnormal conditions.

It never forms an homogeneous and uniformly stained mass of substance but in phloxin red and toluidin blue stained sections, it is stained pink, varying in the same clump from a deep reddish-pink to a yellowish-pink or to orange (figs. 70 and 71).

It is of great importance to duly apreciate since the early stages, the relations that developing inclusions present with normal nuclear constituents.

In the first stages the above mentioned clumps of acidophilic nucleoproteins are exactly situated on a few meshes of the linin network. The linin network is well preserved and easily seen inside the acidophilic substance (fig. 70).

Using Leitz Oc. periplan. 25 × Obj. imm. 1/12 100 × and the white light of a Leitz «Spezial lampe» (6 volt. 6 Amp.) «Nitra», and manoeuvring the diaphragm iris, no minute individual acidophilic particles, granules or richetsiae-like structure can be recognised as forming the inclusion but only the above mentioned acidophilic nucleoprotein placed in the meshes of a well preserved linin-network (fig. 70).

In a later stage, the acidophilic nucleoproteins are more abundant and therefore occupies in a greater extent the linin network which undergo some changes (fig. 71).

Instead of three or four separated clumps, the acidophilic nucleo-

proteins form only two distinct clumps of irregular shape (figs. 6, 10, 18 and 20) separated by a longitudinal space of clear nucleoplasm («butterfly-like» intranuclear figures) on only a more or less semilunar single mass (figs. 7, 14 and 71).

The linin network within the inclusion is somewhat swollen and less apparent than in normal conditions; some of the minute basichromatin particles situated over it are preserved and well stained. Most of them, however, stains less and less with hemalaun, but can be yet recognised in far advanced stages of oxychromatic degeneration (figs. 15, 16, 22 and 72).

These particles of irregular and fairly uniform size give a granular appearance to the inclusions (figs. 4, 5, 6, 16, 28 and 71); these granules, however are clearly basophilic and readily identificated to the basichromatin particles of the linin network (fig. 71).

In well-developed intranuclear inclusions the linin network and the basichromatin particles are better evidenced in basic fuchsin and Loeffler's methylene blue (figs. 4, 5, 6 and 67), and in bordo and hemalaun or in hemalaun alone stained preparations.

For the sake of description we have to consider, in the well developed and typical yellow fever inclusion, a «ground substance» and a «stroma». The «ground substance» corresponds to the acidophilic nucleoproteins above mentioned; they are in part, structures present in normal nuclei of hepatic cells such as oxychromatin, and in part nucleoproteins formed in nucleoplasm under abnormal conditions. Forming the «ground substance» there are not by no means, any minute acidophilic particles or granules, but only an acidophilic substance of variable extension which occupies one (fig. 70) or more meshes (fig. 71) of the linin network. In sections examined with relatively low magnification (600-800 diameters) this substance, when intensely illuminated, contrasts with the linin network whose meshes it occupies, giving a fictitious appearance of acidophilic granules (fig. 18).

The «stroma» corresponds to the linin network which have undergo the following changes: 1° — swelling and deformation of the linin network; 2° — slight swelling and lysis of the basichromatin incrusted thereupon (fig. 72).

The «ground substance» presents the following characteristics and it is obvious that the staining reactions established by Cowdry and Kitchen (1930) in table II for the inclusions, reffer to this substance. With Feulgen's «Nuclealfärbung», the «ground substance» remains unstained (fig. 49) so that it does not contain appreciable amount of thymonucleinic acid

as does basichromatin. Scattered through it, however, there are several slightly stained and rather indistinct granules (fig. 49), which correspond, in all probability, to basichromatin particles of the «stroma» undergoing partial lysis.

Submitted to Unna's «Farben index» the «ground substance» presents the reactions of a basic cellular albumine. It is not stained with Unna's olychromic blue neither with methyl-green. Bordo hämatein-alaun «Färbe-index» shows that it is a carmine stained basic nuclear albumin while mesoplastin stains blue (Unna, 1928, 18). In disparaffined sections treated for 24 hours with a 5 per cent aqueous solution of hydrochloric acid, washed for hours in distilled water and stained with bordo-hemalaun the inclusions are well preserved. The same result is obtained when stronger concentrations of hydrochloric acid, viz. 15, 20 and 30 per cent, are used; in such cases, only a slight solution of mesoplastin (chromatin) is observed, but never a complete one so that the «letzte Grundlage des Kernes» or the «Zellenrumpf» was never evidenced, as is mentioned and illustrated by Unna in bordo and hemalaun stained sections (Unna, 1928, pg. 20). Similar results were obtained by treating the disparaffined sections with 1 per cent aqueous solution of natrium carbonate.

The nuclear changes just mentioned correspond to the yellow fever inclusion; as it can be infered from the foregoing description these changes do occur only in circumscribed portions of the nucleoplasm.

The remaining portion of the nucleoplasm forms a clear space around the inclusion separating it from the nuclear membrane (figs. 7, 15, 22, 28 and 71). In such characteristic halo it is possible in most cases, manoeuvring the diaphragm-iris and using high magnification and Leitz «Spezial lampe» to recognize well stained though scarce remnants of the linin network which is inserted over the nuclear membrane and on another hand is in direct continuity with one or another part of the stroma within the inclusions (figs. 67 and 71). It may be that the linin network undergoing a retrograde process, namely a partial necrosis, retracts itself in the central part of the nucleus and forms there the inclusion (fig. 72); the latter remains yet *en place* because it is attached to the nuclear membrane by well preserved, though in many places disapeared, strongly distended remnants of non-necrotic linin network (figs. 7, 20, 51 and 67). remarks of Cowdry and Kitchen about inclusions as they are seen in fresh cells are not inconsistent with this last view.

Other nuclear change associated with the presence of inclusions is an increase in volume of the basichromatin located near or over the nuclear membrane. In monkeys infected with strong virulent strains of

yellow fever virus, this change was very marked (figs. 31, 32, 33 and 34), while it was less marked in specimens injected with strains of weak virulence (figs. 23, 24 and 25), being slight in humans (figs. 62, 63, 64, 65 and 68).

Up to this time this nuclear change has been mentioned in virus diseases as a «margination» of nuclear chromatin or as an increase of the chromatin placed on the nuclear membrane by «apposition» of new nuclear chromatin.

It is possible that this explanation in true for other intranclear inclusions we have not studied, such as those of herpes, virus III disease, chicken-pox, etc.

As regards yellow fever inclusions, this view is, in our opinion, questionable, as we have ever found well recognisable basichromatin particles over the linin network even in advanced stages of formation of the inclusions, while the so-called «margination» was yet very distinct (fig. 72). The basichromatin over the linin network in nuclei which contains inclusions, moreover, undergo rather marked necrotic changes (lysis) and it seems to us improbable that after suffering such marked chemical changes this same basichromatin particles are able to fuse with the relatively well preserved and well stained chromatin over the nuclear membrane.

In our opinion, figs. 30, 31, 32, 33, 34 and 72 are better explained if we admit simply, a local *swelling* of the basichromatin which is present in normal conditions near or on the nuclear membrane. In the early stages of development of the inclusion, this swelling is not yet very marked, (figs. 20 and 70), and in this stage the retrograde changes interest only a circumscribed portion of the nucleoplasm. Later on, however, it becomes more and more marked (figs. 23, 24 and 25) as the retrograde cellular changes progressively extends over other nuclear constituents and later on over the cytoplasm.

This nuclear change would not be an exceptional occurrence in cytology since local swelling of chromatin on the nuclear membrane was long ago refered by Pianese (1896) in tumor cells.

The nuclei increase in volume not only in the first stages (fig. 70) but later on, when well developed inclusions are present. Thus, in fig. 23 it measures 12 by 8,5 μ, while in fig. 12 the normal nucleus of liver cell measures 6 by 2 μ in diameter. As a consequence, the nuclei became elongated (figs. 21 and 23), and some of them (figs. 32 and 72) became wrinkled, «as if the nuclei had lost water» (Cowdry and Kitchen).

We were not able to find, a material, favorable to the study of terminal stages of oxychromatic degeneration. Even in such livers where over

90 per cent of hepatic cells presented inclusion, these advanced stages were surprisingly scarce. We mean as terminal stages, not those represented in figs. 25 and 72, but those in which all trace of nuclear membrane has disappeared.

In rare instances, the liver cells of injected monkeys show a well preserved nuclear membrane while the acidophilic contents is no more visible (fig. 38). These aspects are not easy to interpret as they, perhaps, are due to an accident of technic, viz., to an artificial extrusion of the inclusions. On the other hand they are suggestive of «empty nuclei» like those seen in human cases (fig. 60).

With Penna de Azevedo we have searched the suprarenals for inclusions and we have found changes in the acidophilic content of nucleoplasm of cortical cells quite suggestive of inclusions. Neverthless we do consider these findings, illustrated in figs. 37 and 40, as not colclusive.

The misunderstanding of structures related to the nucleolus has, in some cases, contributed to bring into discredit really specific intracellular changes of virus diseases.

Therefore we studied with particular care the nucleolus and nucleolar changes in liver cells of rhesus monkeys infected with yellow fever virus before reporting there the presence of intranuclear inclusions.

No difficulty presents itself this study as intranuclear corpuscles are quite numerous and found sometimes in practically all cell in a liver section. Moreover, nucleolar changes are not so conspicuous in monkeys as in man (figs. 5, 6, 7, 14, 15, 16 and 19) and nucleolus appears sharply distinct either topographycally or by staining reactions from the intranuclear changes even in advanced stages of oxychromatic degeneration.

A sharp distinction between nucleoli and intranuclear corpuscles, can be noted in sections stained by Goodpasture's procedure for Negri's bodies (Goodpasture 1925).

1—Disparaffined sections are stained during 10 minutes with a 0.5 per cent fuchsin solution in 20 per cent alcohol; 1 per cent carbolic acid and 1 per cent aniline oil shall be added before using.

2—Rapidly washing in running water, dry with filtering paper and differentiate in 95 per cent alcohol.

3—Wash and stain for some seconds with Loeffler's methylene blue solution recently prepared.

4—Wash. Dishydrate in absolute alcohol. Xylol. Cedar oil. Balm.

Better results are obtained with tissues fixed in Zenker's fluid. When they are fixed in formalin alone fuchsin brings a diffuse and strong staining which requires a slow differentiation in alcohol and discoloration

of the nucleolus itself. In such cases we secured good results by making a very fast differentiation in 90 per cent alcohol, 10 drops of acetic acid being added to every 60 c.c.

When the staining solutions are recently prepared and the differentiation appropriately conducted, the sole structure stained red with fuchsin in normal hepatic cells of rhesus monkey (figs. 1 and 2) is the nucleolus; basichromatin is blue-violet and the membrane of nucleus, blue.

In liver cells of infected monkeys the intranuclear inclusion is stained in tonalities of blue and violet in a sharp contrast with the red stained nucleoli (figs. 4, 5, 6, 7 and 67).

The following method was found very useful in studying nucleolar changes on liver cells of infected *rhesus* monkeys. The structure of amphinucleolus refered by Cowdry and Kitchen is, in our experience, more easily put in evidence by this method than by any other we tried.

1—Fix in Helly's or Zenker's fluid. Paraffin sections of 4—6 μ. Xylol, 100, 90 and 70 per cent alcohol, 70 per cent alcohol stained by iodine, 70 per cent alcohol. After complete discoloration of sections, wash in water.

2—Phloxine red, a 1 per cent solution in distilled water for 10 minutes. Wash.

3—Toluidine blue, a 1 per cent solution (preferably an old one) in distilled water for 10 minutes. Wash.

4—Dry the excess of water and differentiate by a continual shaking in Borrel's glass with 95 per cent alcohol until reappearance of pink colour.

5—Absolute alcohol. Xylol. Cedar oil. Balm.

In sections stained by this method, the nucleolus of normal hepatic cells of *M. rhesus* monkey is stained a deep blue almost black with a darker contour.

A stronger differentiation is more favorable to apreciate the structure previously referred to of an amphinucleolus (fig. 66).

The nucleolar changes in nuclei with intranuclear inclusions may be summarized as follows.

a) swelling and separation of nucleolar components: the nucleolus increases in volume and presents itself as formed by two distinct portions: one of them is smaller and intensely stained a dark blue; the remaining portion of the nucleolus, of larger dimensions, sometimes pear-shaped, sometimes of irregular shape and with indented contour, is stained a diffuse and faint Prussia-blue (figs. 50 and 51). In some nucleoli the swel-

ling is not marked and 2 or 3 a deep blue almost black stained granules can be seen in its borders (figs. 70 and 71).

b) marginating of nucleolar components. The two nucleolar portions mentioned above separate one from another (fig. 51), the deep stained or chromophilic portion turning twards the nuclear membrane.

It becomes there very similar to basichromatin particles which are also found there. In some cases it presents greater dimensions than basichromatin granules. From there it can be readily distinguish, however, in sections stained with Pappenheim-Unna's carbol-methylgrün-pyoronin. By this method basichromatin particles are stained a faint green and the particle of nucleolar origin, a deep red (fig. 39).

The remaining Prussia-blue stained portion of the nucleolus apparently undisturbed can be latter on recognised at the usual seat of the nucleolus.

MORPHOLOGY IN HUMAN CASES

The criterion we adopt in refer as positive the finding of intranuclear inclusions in human cases is to consider as such only typical stages of oxychromatic degeneration (figs. 62, 65 and 68), that is to say, only such stages in which the injuried linin network is enclosed in an acidophilic nucleoprotein and is located on the central part of the nucleus and is separated by a clear space from the nuclear membrane. Completing the picture, there is always a characteristic swelling of the basichromatin deposited near or over the nuclear membrane.

Such stages were previously described by us in infected monkeys as «butterfly-like» and «entamoeba-like» intranuclear figures (figs. 18 and 15).

The chief objections which prevent us from taking into account early stages of oxychromatic degeneration in human cases, were the difficulty in distinguishing such early stages from modifications of oxychromatin and of other nucleoproteins associated to non-specific retrograde changes of the nucleus as well as, in a minor degree, from nucleolar changes and the fact that, in all injected *M. rhesus* monkeys we examined such early stages never did occur single and with exclusion of typical and more advanced stages.

Figures 61, 62, 63, 64, 65, 68 and 69 show intranuclear inclusions as they were seen in three among seventeen human cases we had the opportunity to examine.

Case 5271 (figs. 63, 64 and 65) is a girl, four years old, removed from a yellow fever focus to Oswaldo Cruz Hospital where she died nearly

forty hours after the appearance of the first symptoms, according to Dr. Evandro Chagas. Autopsy was performed thirty minutes after death.

This was the human case in which inclusions were most abundant and could be found in almost every section though by no means they were so numerous there as in infected monkeys.

A peculiar fact in connection with the incidence of inclusions in human cases has called our attention: when, after a careful search an hepatic cell with typical inclusion generally in the vicinity of a portal vein is found, other hepatic cells, never contiguous ones but in close vicinity or in adjoining fields can soon be discovered. It looks as if in each section it would exist a «nest» of cells presenting typical inclusions.

Case 2485 (figs. 61 and 62) was a soldier whose death occurred, according to Dr. Caleb Bomfim, nearly forty-eight hours after the begining of the disease. In this case, intranuclear inclusions were found, likewise in almost all the examined preparations, but as in Case 5271, they were by no means abundant as in the monkey.

The inclusions, sometimes in this Case, show the general characteristics of typical intranuclear inclusions, viz., acidophilic substances placed in the center of the nuclei and always separated by a zone of nucleoplasm free of acidophilic substances from the nuclear membrane where a distinct swelling of basichromatin is to be seen.

However, in such inclusions which we consider as incompletely developed (figs. 61 and 62) the stroma is more apparent and more easily identified to the linin network than is the case, ordinarily, in well developed inclusions and the nucleoplasm on the clear space around the inclusion shows in most cases, a well preserved structure (fig. 62).

Case 5396 was a young man, 19 years old, dying at the 6th day of illness and whose autopsy was performed 23 minutes after death. Intranuclear inclusions (fig. 68) were rather scarce in this Case and not found in every examined preparation.

Typical intranuclear inclusions could not be detected in 14 other human cases (table VIII) we examined. We do not consider, however, this result as unquestionable and we believe that perhaps a more thoroughly search would by chance reveal them in a greater number of patients.

Indeed we shall report that in some of these 14 above mentioned cases, though typical inclusions were wanting, we have found a marked increase of intranuclear acidophilic particles as compared with controls (fig. 59). In such cases we were at loss and we feel that more work is necessary before considering such questionable, though probable, stages of oxychromatic degeneration.

What seems unquestionable is that the strain or strains of yellow fever virus involved in the 1928 epidemy of yellow fever at Rio de Janeiro, Brazil, were weak inclusion formers in man, while they revealed themselves strong inclusion formers in rhesus monkeys infected by direct inoculation of human blood containing virus (Table I).

Certainly this fact is not in support of the view that conditions regarding the presence of virus are fundamentally not different in monkeys and humans, but this is another question to which we will return elsewhere.

It is important for our presentation that specific and non specific intranuclear changes would be clearly distinguished from one another. In other words, it is necessary to fully appreciate intranuclear changes which are associated to common retrograde processes and which may simulate more or less closely true intranuclear inclusions.

The best we could do under the circumstances was to give a special term to each intranuclear alterations which we have considered sufficiently typical and easy to recognise in every circumstance.

With this in mind, we have examined systhematically three liver sections stained with hemalaun and eosin, phloxin red and toluidine blue, and bordo and hemalaun from 17 yellow fever cases and 20 human controls, listing the results in Tables VIII and IX.

The controls were: one case of purulent leptomeningitis (meningococcus), one of typhoid fever, one of septicemia of uncleared etilogy, two of chronic and acute tuberculosis, two of malaria, two of angiocholitis and mulliple liver abcess, two of valvular endocarditis, one of mural endocarditis, two of acute hemorrhagic pancreatitis, one of septicemia and abcess in the brain, two of chronic intersticial hepatitis, two of chronic nephritis and arteriosclerosis, one of acute ulcerative colitis and anemia and one of liver carcinoma.

Intranuclear inclusions: Typical intranuclear inclusions in human cases are located on the central part of the nucleus, being separated from nuclear membrane by a clear space of nucleoplasm. The swelling of the basichromatin over the nuclear membrane is never so marked in man (figs. 65 and 61) as in *rhesus* monkeys specially those injected with the Asibi strain (figs. 31 and 34).

In our material, either from the monkey or from the man, inclusions were not formed «within the nucleus in colony-like masses of which the individual particles are about the size of most ricketsiae», as described by Cowdry and Kitchen in their material.

Yellow fever inclusions, in our material, are formed by a «ground

substance» and a «stroma» (figs. 71 and 69). The ground substance is a new substance formed as the result of the abnormal process in the nucleus. It is probably made out of several acidophilic nucleoproteins related in part to oxychromatin and in part surely to other nucleoproteins coming from nucleoplasm.

In early stages the acidophilic nucleoproteins just refered are located but in a few meshes of the linin network. When seen, then, with the magnification of 600 to 1000 diameters in a strongly illuminated microscopic field, the pink stained material becomes more conspicuous than the network, assuming the false aspect of granules (fig. 68). Examination with a stronger magnification and the white light of a Leitz' «Speziallampe» Nitra, specially if different apertures of the diaphragm-iris are employed, shows a stroma which corresponds to the altered linin network of nucleoplasm within the inclusion (fig. 69).

In the above mentioned optical conditions, «stroma» is formed by a network and by basophilic particles or granules incrusted on the network. These granules of irregular and fairly uniform size corresponds to basichromatin particles a little swollen and undergoing lysis and therefore, feebly stained with hemalaun (fig. 69).

Amphinucleoli are, as a rule, easily distinguishable either topographically or by staining reactions from the inclusion, as we have remarked in the rhesus monkey (Torres, 1928c, 1928j). In some cases, a double nucleolus is present; generally, as have remarked Cowdry and Kitchen, the nucleolus is more or less preserved, while, in the same preparations, nucleolar changes are rather marked in hepatic cells which do not present inclusions.

Erythrocyte-shaped granules: One or two minute, rounded, sharp-outlined, deeply eosin stained, acidophilic granules (figs. 57, 58 and 60) are sometimes seen within the nucleoplasm of a liver cell. In such cells the linin network and the nuclear membrane shows, as a rule, no conspicuous alterations from normal.

Sometimes the central part of the acidophilic granule is clear and presents a marked contrast with the periphery: the erythrocyte appearance is then, very striking (fig. 57 and 58).

Often these peculiar granules are found within «empty nuclei» near the nuclear membrane and the remnants of linin network (fig. 60) either in yellow fever cases or in other diseases.

The regular round shape and sharp outlines that they present when examined with obj. imm. 1/12 and Ocular periplan. 4× or 8× Leitz, becomes less apparent when Leitz Ocul. periplan 12× or 25× Leitz and Leitz

«Speziallampe» (6 volts, 6 Amp.) are employed. The sharp outlines are lessened in such conditions and the shape becomes somewhat irregular. In such conditions it becames evident that the erythrocyte-shaped body is made up of an acidophilic substance (oxychromatin ?), deposited in two or three meshes of the linin network. The strong contrast between this deeply pink stained substance and the meshes of the linin network explains the striking erythrocyte-like appearance of the granule when examined with 800-1000 diameters and in a strongly illuminated microscopic field.

Basichromatin over the nuclear membran is never swollen in this type of nuclear change, as is the case with intranuclear inclusions (figs. 57, 58 and 60).

Acidophilic particles—Several minute, irregular, acidophilic particles, sometimes in distinct clumps (figs. 59 and 56) are sometimes found inside the nuclei of liver cells, either in yellow fever cases (fig. 59) or in other diseases (fig. 56).

Distinction is somewhat delicated with erythrocyte-shaped bodies, but in most cases the acidophilic particles (oxychromatin ?) follows to some extent the meshes of the linin network presenting, therefore, an irregular and frindged outline. Its outlines, are, moreover, markedly lessened when higher magnifications are employed and diaphragm-iris manoeuvred.

Basophilia of nucleoplasm—Blue stained nucleoplasm, sometimes only in the vicinity of blue stained nucleoli are a frequent occurrence in shrinked nuclei of liver cells, either in yellow fever or in other diseases (fig. 55).

This nuclear change is more or less alike the condition previously refered by us in uninjected monkeys (Torres, 1921 a, and ifgs. 44 and 45). Sometimes an apparent lysis of intranuclear basichromatin takes place in such blue stained nuclei.

Nucleolar multiplicity—Multiplicity of nucleoli and an considerable range of variation in site of the newly formed nucleoli, is a striking nuclear change in yellow fever (figs. 59 and 54).

In some cases the smaller nucleoli represents 1/5 or less of the size of the larger nucleoli in the same nucleus (figs. 59 and 54). In spite if its minute dimensions, that micronucleus, as very other nucleoli within the nuclei, presents the structure of a true amphinucleolus in sections stained with phloxin red and toluidine blue.

In the interkinetic nucleus of liver cells it occurs, therefore a reproduction or multiplication of the nucleolus very marked in yellow fever, but occurring also in other diseases (tables VIII and IV).

Sometimes a micronucleolus is mixed with acidophilic particles and

in a microscopic field strongly illuminated it looks as if stained pink himself, which is not true, as one can see manoeuvring the diaphragm-iris and using higher magnifications. This was the case in fig. 59. In such cases complexes intranuclear figures simulating more or less closely true intranuclear inclusions do occur.

Empty nuclei: Figure 60 shows empty nuclei as seen in a yellow fever human case. They are similar to the structures illustrated in figure 48 of Cowdry and Kitchen's paper (1930).

Swelling of nucleoli was found either in yellow fever cases (fig. 53) or in other diseases. The nucleolus presents, in some cases, an acidophilic core and a basophilic center, (fig. 53).

INTRANUCLEAR CORPUSCLES AND YELLOW FEVER VIRUS

Yellow fever being a disease due to an ultramicroscopic virus, it becomes impossible on a morphologic ground either to ascertain or to deny that a filter passing organism is actually present inside the intranuclear corpuscle. It will be noted that this have not yet be done for unquestionable intracellular corpuscles such as Negri's, Guarnieri's and Bollinger's bodies.

Indeed, employing the microscopic now in use, a particle less than 0.2 μ in diameter is just on the limit of clear vision, «for resolution depends on 1/2 μ /n. a. which, using white light and the best lenses, is about 0.2 μ » (Martin, 1929). The physical and optical limitations which are imposed by theory are approached (Barnard, 1929). Filtration through collodion films indicate that the diameter of the particles of the viruses of mosaic disease, fowl pleague, foot-and-mouth disease, rabies, neurovaccinia, herpes and bacteriophage was of the same order of magnitude as that of a protein molecule, or 2-3. μ. Other experiments, however indicate a magnitude equal to or greater than that of the particles in the «collargol», viz., 20 μ (Martin).

Consequently, the relation between ultramicroscopic viruses and their specific intracellular changes may be dealt only in an indirect way and that is what we will try to do by accumulating data which refer to it.

The data are given in tables I-VII and concern the relation between the presence of yellow fever virus in blood and tissues (demonstrated by positive inoculationn into susceptible animal and by typical lesions) and the presence of intranuclear inclusions in hepatic cells.

The results of inoculation into receptive animal are indicated in only some of them, either because the findings at necropsy and on histolo-

gical examination of the tissues were considered a sufficient proof of positive infection or because we were not able to obtain further informations.

The frequency by which intranuclear inclusions appear in inoculated monkeys is striking.

They are found in all of 6 animals (table I) inoculated with blood withdrawn during the first 72 hours of disease from yellow fever patients (epidemy of 1928, at Rio de Janeiro).

They are present in 3 of 4 monkeys which had been bitten by *Aedes aegypti* infected in yellow fever patients or in *M. rhesus* monkeys inoculated with the F. W. Brasilian strain or the African strain «Asibi» (Table II). The monkey in which they were absent was not infected as shown by autopsy and inoculation into another monkey.

They are present in all of 12 animals (table IV) inoculated with blood from monkeys infected by the African strain «Asibi». They appear, however, in only 4 of 8 animals inoculated with blood from monkeys infected by South-American strains (Table III).

They do exist in all of 10 specimens (Table VI) inoculated with Asibi strain (liver emulsion). They are present, however, in only 7 of 14 *M. rhesus* monkeys inoculated with Brazilian strains (Table V). Such results mentioned above are confirmative of the irregularity in virulence recognised in South-American strains of yellow fever virus (Aragão, Cunha and Muniz, Davis, Monteiro) as compared with the West African strain Asibi.

They are found in 12 of 15 animals inoculated with an emulsion or excreta of infected *Aedes aegypti* (Table VII).

If one admits the assertion that the intranuclear bodies are connected inn some way with the presence of the parasite inside the cells, it will be of interest to determine the relation between the development of inclusions and the stage of the disease.

Intranuclear corpuscles are regularly found and sometimes quite numerous in all thirty three *M. rhesus* monkeys injected with Asibi strain and examined 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 17, 21 and 25 days following inoculation (Tables IV, VI and VII).

In *M. rhesus* monkeys injected with Brazilian strains, they are not found in two examined 3 days (Tables III and VII), in one 4 days (Table VII), in one 5 days (Table V), in one 6 days (Table III) in one 8 days (Table II), in one 9 days (Table V) in one 10 days (Table VII), in one 11 days (Table V), in two 12 days (Tables III and V) and finally in three respectively 18, 19 and 28 days following inoculation (Table V). They are present, but sometimes rather scarce other times very numerous, in four

rhesus monkeys examined 5 days (Tables I, II and V), in three 6 days (Tables III and V), in one *cynomolgus* monkey 7 days (Table I), in two *rhesus* monkeys 8 days (Tables I and V), in one 9 days (Table I), in five 10 days (Tables III, V and VII), in one 11 days (Table I), in one *cynomolgus* monkey 15 days (Table III) and in one *rhesus* monkey 15 days (Table I), in one 19 days (Table V) and finally in one 36 days following inoculation (Table V).

It appears, therefore, that virulence of the strain of yellow fever virus employed is a capital factor in the development of intranuclear inclusions in the monkey.

Tables III and V are suggestive of an increasing incidence and a gradual disappearance of intranuclear corpuscles, accordin to the stage of the disease in monkeys infected with Brazilian strains. Such interpretation, however, is open to criticism since several Brazilian strains are concerned and no one was carried out for a sufficient number of unbroken passages through *M. rhesus* monkeys.

Neverthless it is probable that in yellow fever, as in herpes (Goodpasture, 1925a), an increasing incidence and gradual disappearance of specific nuclear changes actually takes place und runs paralled with the stage of the disease. This point would be duly appreciated only when a strain of low virulence is employed, as is the case with the monkeys listed in Tables III and V. We could not detected it in thirty-three *rhesus* monkeys which were killed, sometimes within 3 days, by the rather virulent West African strain Asibi (Tables IV, VI and VII). This phenomenon, likewise apparently did not occur in fifty rhesus monkeys examined by Cowdry and Kitchen: twenty nine were injected with French strain and twenty-one with Asibi strain; French strain is a rather virulent one since two injected monkeys died on the 3th day, and ten on the 4th day of inoculation (Cowdry and Kitchen, 1930).

The practical result is that the stage of experimental yellow fever in which infected specimens shall be killed in order to ascertain the presence of intranuclear inclusions presents considerable variation according to the virulence of the strain of yellow fever virus besides probable variations according the kind of animal employed. Working with *M. rhesus* and strains of low virulence, inclusions are more liable to be found in those killed at about 10 days following the inoculation than earlier, viz. 3 days, or later, on viz., after 15 days. Working with highly virulent strains, however, inclusions are easily found in animals dying in the third day of inoculation, or even earlier, as reported by Cowdry and Kitchen.

In conclusion, the foregoing tables show a considerable range in the length of yellow fever induced in *M. rhesus* monkeys. Specimens sometimes die on the 21th (Table VII), 25th (Table IV) and 36th day following inoculation with histo-pathological changes indicative of an acute stage. One gets the impression that the period of incubation of the disease is uncertain, that prolonged forms of the infection are not infrequent and that there is insufficient information as to duration of yellow fever induced in *M. rhesus* monkey by low virulent strains like F. W. strain.

In our experience, when the *rhesus* monkey injected with yellow fever virus does not develop an acute typical disease, the typical lesions described by Stokes, Bauer and Hudson are sometimes not easily recognised and distinguished from changes induced by dysentery or other intercurrent diseases. This was particularly true in specimens we examined injected with Brazilian strains; in such cases the intranuclear inclusions have assumed a great diagnostic importance.

It is a matter of fact a positive histo-pathological diagnosis of yellow fever in *M. rhesus* monkey should never be stated in the absence of specific intranuclear inclusions within liver cells.

Concluding, intranuclear inclusions in yellow fever may be associated with the presence *in loco* of ultra-microscopic micro-organisms. But they may, likewise, represent only injury done to hepatic cells by the virus which afterwards may disappear from the blood and the tissues so that intranuclear inclusions are but a late consequence of the injurious agent.

Whichsoever be the case, the easiest explanation, we think, of the scarcity of specific inclusions in humans as compared with their abundance in monkeys, is to be found in differences regarding the distribution of yellow fever virus in both animals.

It is clear that if intranuclear inclusions are a specific change in hepatic cells associated to infection with yellow fever virus, they will only occur when the injurious agent, in this case the yellow fever virus, is present in sufficient amount and acts during a sufficient lenght of time.

Logically it ensues that the greater the amount of virus and length of time during which the virus acts will be, the stronger will be also the injury.

Are the conditions regarding the presence of yellow fever virus absolutelly the same in monkeys and human ?

Certainly not; the infectivity of blood and of tissues decreases and even disappears, as a rule, in yellow fever patients after the third day of

disease: less virus in blood and in tissues, more scarce the inclusions in liver cells.

On the contrary, transmission experiments are easily obtained with infected monkeys during a length of time distinctly greater than in with humans: more virus in blood and in tissues acting during a greater length of time, more abundant the inclusions in liver cells.

Our findings in man, in agreement with those of Cowdry and Kitchen are not consistent with the belief that intranuclear corpuscles represent the actual presence of yellow fever virus inside the liver cells.

Indeed, we have found them, though very scarce, in a patient dying the 6th day of disease (Table VIII).

This fact can be explained if we explained if we admit that intranuclear corpuscles are merely a partial necrosis of the nucleus and may represent a change which persists even after entire disappearance of the noxious agent. If this injurious agent is the living ultramicroscopic microorganism itself, it looks even more probable that its life and reproduction is rather checked than stimulated by well developed meronecrosis.

INTRANUCLEAR INCLUSIONS IN YELLOW FEVER AND IN HERPES

We have figured (Torres, 1928 b, figs. *d*, *e* and *h*, 1928 c, figs. *c* and *e*, 1929 d, figs. *b*, *c*, *f*, *g*, *h* and *i*) and remarked that in liver cells presenting yellow fever inclusions the nucleoli were quite distinct either topographically or by staining reactions from the inclusions. In a coloured plate (Torres, 1929a) we have represented the nucleoli in all figures, even in figs. *i*, *j* and *k* which «show end stages of oxychromatique nuclear degeneration». In fig. *h*, where the nucleolus is not represented, the text informs that «the plane of sectioning accounts probably for it».

Cowdry and Kitchen studying liver sections mounted side by side on the same slides of *Macacus rhesus* containing the yellow fever inclusions and of *Cebus hypoleucus* monkey containing herpes inclusions, have established by direct comparison that several points of distinction do exist between the two kinds of inclusions, viz., discrepancies in the staining properties and in the separation or cleavage between the acidophilic and basophilic constituents of the nucleus, the mode of the heaping up of the acidophilic material. Another difference is that the morphology of the individual particles of the inclusions is much more uniform in yellow fever than in herpes. The typical droplets of variable size and the amorphous masses seen in herpes are almost never met with in yellow fever.

TABLE I

Monkeys injected with blood of yellow fever patients [1] within the first 72 hours.

Ner. of injected animal	Length of experimental disease	Result of inoculation to susceptible animal (*M. rhesus*)	Typical intranuclear inclusions in hepatic cells	Remarks
M. rhesus 8 Ar. [2]	5 days		Present; abundant	Spontaneous death of inoculated animal. The patient was a benign case. At autopsy, typical yellow fever lesions in liver sections.
M. cynomolgus 7 Ar.	7 days		Present	Spontaneous death of inoculated animal. At autopsy, typical yellow fever lesions in liver sections.
M. rhesus 478 Ar.	8 days	Positive	Present	Inoculated with 8 cc. of blood of suspect case. Spontaneous death of inoculated animal. At autopsy, yellow fever lesions in liver sections.
M. rhesus 37 Ar.	9 days		Present; not abundant	Spontaneous death of inoculated animal. The patient was a fatal case At autopsy, typical lesions of yellow fever in liver and kidneys.
M. rhesus 6 C. Mn. [3]	11 days	Positive	Present	Spontaneous death of inoculated animal. The patient was a benign case and the isolated strain become the F. W. Brazilian strain.
M. rhesus 9 Art.	15 days		Present; rare	Inoculated with blood of two benign cases.

[1] — Epidemy of 1928, at Rio de Janeiro, Brazil.
[2] — Material obtained by courtesy of Dr. H. de Beaurepaire Aragão.
[3] — Material obtained by courtesy of Drs. A. Marques da Cunha and J. Muniz.

TABLE II

M. rhesus monkeys bitten by infected Aedes aegypti.

Ner. of injected animal	Length of experimental disease	Result of inoculation to susceptible animal (*M. rhesus*)	Typical intranuclear inclusions in hepatic cells	Remarks
M. rhesus 35 Ar.	5 days		Present	Spontaneous death of inoculated animal. Mosquitoes fed in yellow fever patient. At autopsy, typical histologic lesions of yellow fever.
M. rhesus 226 Ar.	6 days		Present	Killed in agony. At autopsy, typical yellow fever lesions in liver and kidneys.
M. rhesns 32 C. Mn.	8 days	Negative	Absent	Bitten by two apparently not infected *A. aegypti* fed in *rhesus* 25 (F. W. strain). Lesions of experimental yellow fever absent in liver section of 32 C. Mn.
M. rhesus 400 Ar.	8 dyas		Present	Killed. Mosquitoes infected with African virus Asibi. At autopsy, typical histologic lesions of yellow fever.

TABLE III

Animals inoculated with blood of infected monkeys (Brazilian strains of yellow fever virus)

Ner. of infected animal	Length of experimental disease	Result of inoculation of susceptible animal (*M. rhesus*)	Typical intranuclear inclusions in hepatic cells	Remarks
M. rhesus 28 Ar.	3 days		Absent	Eearly death by peritonitis. Lesions of experimental yellow fever absent in liver sections.
M. rhesus 98 Ar.	6 days	Negative	Absent	Fever after inoculation. Killed as survival was liable to occur. At autopsy, right bronchopneumonia, petechiae in pleura, fatty degeneration of liver, right chronic fibrous pleurisy. Lesions of experimental yellow fever absent.
M. rhesus 16 C. Mn.	6 days	Positive	Present; abundant	Injected with F. W. strain. Killed after fall of temperature. Lesions of experimental yellow fever present in liver sections.
M. rhesus 100 Ar.	10 days	Negative	Present	Injected with infected *rhesus* serum keeped in the cold for about 24 hours. Irregular fever. Killed.
M. rhesus 76 Ar.	10 days	Negative	Present; abundant	Injected with 0cc.2 of serum of infected *M. cynomolgus*. Killed.
M. rhesus 78 Ar.	10 days		Present; not abundant	Inoculated with blood of infected *M. cynomolgus* 56 Ar. Spontaneous death. Typical lesions of experimental yellow fever in liver sections.

M. rhesus 74 Ar.	12 days		Absent	Inoculation with blood of injected *M. rhesus* that survivied after presenting itself irregular fever. Killed. At autopsy, chronic tuberculosis of lungs, liver and spleen. No lesions of experimental fever in liver sections.
M. cynomolgus 15 C. Mn.	15 days		Present; not abundant	Injected with F. W. strain. Spontaneous death. Lesions of experimental yellow fever present in liver sections.

TABLE IV

Animals inoculated with blood of infected monkeys (African strain Asibi of yellow fever virus)

Ner. do injected animal	Length of experimental disease	Result of inoculation susceptible animal (*M. rhesus*)	Typical intranuclear inclusions in hepatic cells	Remarks
M. rhesus 457 Ar. Cl. 1	5 days		Present; abundant	Inoculated with emulsion of three supposed infected mosquitoes. Reinoculated the 24/IV virulent blood. Killed the 29/VI. Lesions of experimental yellow fever in liver sections.
M. rhesus 445 Ar.	5 days		Present; not abundant	Inoculated with *rhesus* 428 blood. Spontaneous death.
M. rhesus 485 Ar. Cl.	5 days		Presen	Inoculated with 2 cc. of *rhesus* 478 blood. Typical lesions of experimental yellow fever in liver sections.
M. rhesus 489 Ar. Cl.	5 days		Present; abundant	Inoculated with 1 cc. of *rhesus* 479 blood. Killed. Typical lesions of experimental yellow fever in liver sections.
M. rhesus 443 Ar.	6 days		Present	Inoculated with *rhesus* 427 blood. Kiled. Typical lesions of experimental yellow fever in liver sections.
M. rhesus 476 Ar. Cl.	6 days	Positive	Present	Killed. Typical lesions of experimental yellow fever in liver sections.
M. rhesus 480 Ar. Cl.	6 days		Present	Inoculated with *rhesus* 476 blood. Typical lesions of experimental yellow fever in liver sections.

M. rhesus 198 Ar.	7 days	Positive	Present; abundant	Inoculated with a 10 cc. emulsion of dried blood kept in vacuum received from New York U. S. A. Killed. At autopsy, typical microscopic lesions of yellow fever in liver and kidneys.
M. rhesus 444 Ar.	8 days		Present; abundant	Inoculated with *rhesus* 429 blood. Killed.
M. rhesus 455 Ar. Cl.	10 days		Present	Killed.
M. rhesus 467 Ar.	12 days		Present	Inoculated with *rhesus* 449 blood. Spontaneous death.
M. rhesus 434 Ar. Cl.	25 days		Present	noculated the 25/V/929 with excreta of 6 mosquitoes infected 5 days previously. Reinoculated the 13/VI with virulent blood. Killed the 8/VII.

[1] — Material obtained by courtesy of Drs. H. de Beaurepaire Aragão and A. da Costa Lima.

TABLE V

Monkeys injected with emulsion of virulent liver (Brazilian strains of yellow fever virus)

Ner. of injected animal	Length of experimental disease	Result of inoculation to susceptible animal (*M. rhesus*)	Typical intranuclear inclusions in hepatic cells	Remarks
M. rhesus 21 C. Mn.	5 days		Present; scarce	Injected with liver of *rhesus* 17 (F. W. strain). Spontaneous death.
M. rhesus 19 C. Mn.	5 days	Positive	Absent	Injected with liver of *rhesus* 16 (F. W. strain). Killed.
M. rhesus 22 C. Mn.	5 days		Present; not abundant	Injected with liver of *rhesus* 19 (F. W. strain). Killed.
M. rhesus 14 C. Mn.	6 days	Positive	Present; not abundant	Injected with liver of *rhesus* 8 (F. W. strain). Abcess in wall of abdomen. Killed.
M. rhesus 17 C. Mn.	6 days	Positive	Present; not abundant	Injected with liver of *rhesus* 14 (F. W. strain). Spontaneous death.
M. rhesus 8 C. Mn.	8 days	Positive	Present; not abundant	Injected with liver of *rhesus* 6 (F. W. strain). Killed.
M. rhesus 28 C. Mn.	9 days		Absent	After presenting fever, temperature fall to normal. Killed. Injected with liver of *rhesus* 25 (F. W. Brazilian strain).
M. rhesus 23 C. Mn.	10 days		Present	Injected with liver of *rhesus* 17 (F. W. strain). Spontaneous death.
M. rhesus 120 Ar.	11 days		Absent	Irregular fever. Killed.

M. rhesus 36 C. Mn.	12 days		Absent	Injected with liver of *rhesus* 32 (F. W. strain). *Rhesus* 32 was sticked by two apparently not infected mosquitoes.
M. rhesus 9 C. Mn.	18 days		Absent	Injected with filtrate emulsion of liver of infected *rhesus* (F. W. strain) dead of septicemia.
M. rhesus 116 Ar.	19 days		Absent	Irregular fever. Killed. At autopsy, several parasitic nodules in apex of both lungs.
M. rhesus 60 Ar.	28 days		Absent	Female, adult specimen, poorly nourished weighing 2100 grs. At autopsy, several parasitic nodules in lungs and intestine, scarce in liver.
M. rhesus 20 C. Mn.	36 days		Present	Injected with emulsion of liver (F. W. strain) and inactivated serum (by heat) of same monkey (*rhesus* 17 F. W. strain). Spontaneous death.

TABLE VI

Monkey injected with emulsion of virulent liver (African strain Asibi).

Ner. of injected animal	Length of experimental disease	Result of inoculation to susceptible animal (*M. rhesus*)	Typical intranuclear inclusions in hepatic cells	Remarks
M. rhesus 56 C. Mn.	3 days		Present; scarce	Injected with virus and serum from recently recovered yellow fever case. Spontaneous death.
M. rhesus 57 C. Mn.	3 days	Positive	Present; abundant	Injected with emulsion of liver from recently killed monkey (*rhesus* 53). Killed when temperature was 40.9C.
M. rhesus 58 C. Mn.	3 days	Positive	Present; abundant	Injected with emulsion of liver from recently killed *rhesus* 57. Spontaneous death.
M. rhesus 52 C. Mn.	4 days	Positive	Present; abundant	Injected with emulsion of liver from recently killed *rhesus* 207 Ar. Spontaneous death.
M. rhesus 52 C. Mn.	4 days		Present; abundant	Injected with emulsion of liver from recently killed *rhesus* 207 Ar. Killed.
M. rhesus 55 C. Mn.	5 days		Present; abundant	Injected with emulsion of liver from *rhesus* 51 kept in the cold for about 24 hours. Spontaneous death.
M. rhesus 54 C. Mn.	6 days		Present	Injected with equal parts from emulsion of liver (*rhesus* 51) and from serum (heated to 55oC.) of *rhesus* 50. Spontaneous death.

M. rhesus 204 Ar.	7 days		Present; scarce	Injected with 2 cc. of serum from suspected recovered yellow fever case and 24 hours after with 1 cc. of liver from *rhesus* 198 Ar. Spontaneous death.
M. rhesus 50 C. Mn.	7 days		Present	Injected with emulsion of virulent liver kept in the cold for 7 days. Spontaneous death.
M. rhesus 62 C. Mn.	7 days		Present; abundant	Injected with emulsion of liver from *rhesus* 58 kept in the cold for 4 dhys. Killed in agony.

TABLE VII

Monkeys inoculated with emulsion or with excreta of infected mosquitoes (Aedes aegypti)

Ner. of injected animal	Length of experimental disease	Result of inoculation to susceptible animal (*M. rhesus*)	Typical intranuclear inclusions in hepatic cells	Remarks
M. rhesus 24 C. Mn.	3 days		Absent	Injected with emulsion of infected mosquitoes (Brazilian strain F. W.). Spontaneous death.
M. rhesus 43 C. Mn.	4 days		Absent	Injected with emulsion of mosquitoes fed in *rhesus* 32 (Brazilian strain F. W.) Killed when in agony.
M. rhesus 412 Ar.	5 days		Present	Injected with emulsion of infected male mosquitoes (African strain Asibi).
M. rhesus 273 Ar.	7 days		Present	Injected with emulsion of five infected mosquitoes (African strain Asibi). Spontaneous death.
M. rhesus 482 Ar.	7 days		Present	Injected with emulsion of two infected male mosquitoes (African strain Asibi). Spontaneous death.
M. rhesus 428 Ar.	9 days	Positive	Present; abundant	Infected by excreta of infected mosquitoes put on the skin (African strain Asibi).
M. rhesus 479 Ar. Cl.	9 days	Positive	Present	Infected by excreta of two infected mosquitoes (African strain Asibi). Spontaneous death.
M. rhesus 19 Ar.	10 days		Absent	Injected with mosquitoes fed five days previously in a fatal case of yellow fever Killed.

M. rhesus Ar. Tx. [1]	10 days	Positive	Present; abundant	Injected with emulsion of five infected mosquitoes (Brazilian strain). Killed.
M. rhesus 483 Ar.	10 days		Present	Injected with emulsion of four infected mosquitoes. Killed.
M. rhesus 459 Ar. Cl.	12 days		Present	Injected with emulsion of infected mosquitoes (African strain Asibi). Killed.
M. rhesus 429 Ar. Cl.	14 days	Positive	Present	Inoculated with the legs of infected mosquitoes (African strain Asibi). Spontaneous death.
M. rhesus 449 Ar.	14 days	Positive	Present; abundant	Infected by excreta of infected mosquitoes put on the skin (African strain Asibi).
M. rhesus 456 Ar.	17 days		Present	Infected by excreta of two infected mosquitoes at VI. 8 (African strain Asibi). Reinoculated at VI. 24 the afternoon. Killed at VI.25 the morning.
M. rhesus 464 Ar. Cl.	21 days		Present	Injected with emulsion of infected male mosquitoes (African strain Asibi). at VI. 40. Dead at VII. 1. At autopsy, typical yellow fever lesions in the liver.

[1] — Material obtained by courtesy of Drs. H. de Beaurepaire Aragão and José Teixeira.

PLAT

Case N.	Sex	Age	Race and nationality	Stage of disease in which death occurred	Time elapsed between death and necropsy	Typical in
5271	female	4 years	white, brasilian	40 hours	30 minutes	Preser
2485	male		brasilian	nearly 48 hs.		
5400	male	26 years	white, portuguese	3th day	2 hs. 30 minutes	
6005	male	19 years	white, portuguese	3th day	13 hs. 30 minutes	
2484	male			4th day		
5403	male	38 years	white, portuguese	5th day	4 hs. 30 minutes	
5395	male	39 years	white, portuguese	5th day	6 hs. 30 minutes	
2530	male	21 years	white	5th day	21 hs.	
5396	male	19 years	white, brasilian	6th day	23 minutes	pres
5390	male	31 years	white, austrian	7th day	5 hs.	
5284	male	26 years	white, switzer	7th day	3 hs.	
4134	female	15 years	white	7th day		
5407	male	22 years	mulato, brasilian	8th day	40 minutes	
5406	male	22 years	mulato, brasilian	9th day	9 hs.	
5402	male	13 years	mulato, brasilian		12 hs.	
5397	male	40 years	white, portuguese		1 h. 10 minutes	

E VIII

intra-nuclear clusions	Erythrocyte-shaped bodies	Acidophilic particules	"Empty nuclei"	Basophilia of nucleoplasm	Swelling of nucleolus	Increase in number of nucleoli
t; relatively umerous	present					present
present	present					present
absent		present				present
absent						
absent		present			present	present
absent	present	present			present	
absent	present	present			present	
absent	present	present	present			
nt; scarce	present; numerous		present			present
absent		present			present	present
absent	present; numerous				present	
absent						
absent	present; sometimes 5 or 6 in same nucleus	present			present	present
absent		present		present	present	present
absent	present; scarce	present	present	present	present	present
absent	present; scarce	present	present		present	present

PL

Nuclear changes of liver

N. of autopsy	Anatomic diagnosis	Typical intranuclear inclusions of virus diseases	Erythrocyt shaped bod
1826	Carcinoma of liver	absent	
1827	Tuberculosis	absent	
1837	Malaria	absent	
1851	Pancreatitis hemorrhagica	absent	presen
1960	Leptomeningitis purulenta (meningococcus)	absent	
2250	Nephritis chronica	absent	
2332	Typhoid fever	absent	
2344	Endocarditis verrucosa mitralis	absent	presen
2425	Pancreatitis hemorrhagica	absent	present
2431	Malaria	absent	
2445	Hepatitis interstitialis chronica	absent	
2543	Cholangitis and liver abcesses	absent	
2544	Malaria	absent	
2555	Endocarditis aortica	absent	
2558	Carcinoma of gall-bladder	absent	
5004	Septicemia	absent	presen
5010	Hepatitis interstitialis c hronica	absent	
5011	Nephritis chronica	absent	
5018	Colitis ulcerosa and anemia	absent	
5023	Tuberculosis	absent	

ATE IX

cells in various diseases

te-lies	Acidophilic particles	"Empty nuclei"	Acidophilic nuclear vacuoles	Basophillia of nucleoplasm	Swelling of nucleolus	Increase in number of nucleoli
	present		present		present	present
	present					
			present		present	
t						
				present	present	
				present		
		present				
	present	present				
	present				present	
				present		
					present	
	present				present	
	present				present	present
			present		present	
			present			
				present		

As a result of their observations, Cowdry and Kitchen wrote:

«Though no microchemical difference could be detected the process of inclusion formation in herpes is radically different from that found in yellow fever. The inclusion arises in herpes, not as a regular individual spherical clumps composed of closely packed fine particles, but as a more or less even cloud-like deposits of acidophilic particles in the centers of the affected nuclei. The nucleoli, moreover, do not persist in herpes as in yellow fever, but are destroyed, or else soon marginate with the rest of the basophilic chromatin on the nuclear membrane». (Cowdry and Kitchen, 1930).

The preservation of nucleoli in yellow fever inclusions and their early disappearance in herpes inclusions are one of the most evident differential characteristics between then, in the opinion of Cowdry and Kitchen.

By the way, we shall say that we have never considered the inclusions of yellow fever as being identical to those of herpes, chicken-pox, and virus III disease, and virus III disease, and this would be infered from our first note since inclusions in herpes, chicken-pox, and virus III disease are not, themselves, identical to one another. What we mean in our first note is to express the idea that in yellow fever we have found intranuclear bodies only within the nucleus, as is the case in herpes, chicken-pox and virus III disease. This appears, perhaps, more clear in the paper we published in September, 1928 were we wrote:

«Em um segundo grupo (de doenças de virus filtraveis), estão aquellas em que as inclusões se localisam exclusivamente no nucleo, taes, entre outras, o herpes simples, o herpes symptomatico, o virus III do coelho e a varicella... A verificação que acabamos de fazer leva a incluir a febre amarella no segundo grupo acima citado». (Torres, 1928g).

The english translation is a follows:

«In a second group (of filtrable virus diseases) there are those diseases in which the inclusions are located only on the nucleus such as, among others, herpes simplex, symptomatique herpes, virus III of rabbits and chicken-pox... The verification we have just stated allows the inclusion of yellow fever in the above mentioned second group».

Rivers, Haagen and Muckenfuss (1929 a and b) have developed a method by which susceptible tissues infected with viruses and cultivated *in vitro* regularly evidence the characteristic intracellular alterations or «inclusions bodies». Employing cornea of recently enucleated rabbit's eyes and inoculating it with vaccine and *herpes febrilis* viruses, they obtained regularly the development in the epithelial cells of the cornea of characteristic vaccinal and herpetic lesions, including Guarnieri bodies and acidophilic nuclear inclusions respectively.

In a attempt to know if rabbit's cornea was a susceptible tissue to

yellow fever virus so that Rivers, Haagen and Muckenfuss'method should be applied to yellow fever, we have made the following experiments.

Five rabbits were inoculated with yellow fever virus by scarification of the right cornea and deposition over it of virulent material. This was serum of a recently bled rhesus monkey infected with «French» strain of yellow fever and in the first day of fever. Care was taken so as to prevent the eye-lids from covering the inoculated eye-ball for nearly five minutes.

The rabbits were killed, two the 4th day, one the 5th, one the 7th and one the 15th day after inoculation and sections of the injected cornea stained with hemalaun and eosin examined.

No yellow fever inclusions were detected in the epithelial cells of the cornea.

Nevertheless, in specimens killed the 4th day, it was possible to recognise local hyperplasia of cells and thickening of the cornea on the scarifyed spots.

Same results were obtained with two *Pseudocebus azarae* a monkey which, in the experience of Aragão (1929 b) presents a febrile reaction when injected with yellow fever virus. The monkeys were injected with the same material applied to the rabbits, and inoculation was made in scarifyed cornea and intraperitoneally.

No definite conclusion can be drawn from those experiments as only a few animals were available and the specimens killed, possibly, in an inadequate time for the development of yellow fever inclusions in the rabbit.

If subsequent studies, however, will show that infected rabbit corneas do not develop yellow fever inclusions, this will be another point of distinction, and this a biological one, between yellow fever and *herpes febrilis* inclusions. The latter, indeed, regularly occur in rabbit corneas infected and cultivated *in vitro* according to the method described by Rivers, Haagen and Muckenfuss (1929 a and b).

DISCUSSION

We have mentioned that yellow fever inclusions are formed by a «ground substance» and a «stroma».

The «ground substance» is an acidophilic nucleoprotein, apparently, in a great extent foreign to the normal nucleoplasm.

It is well known that, in a general way, when cells undergo necrosis, some of its constitutive nuclear or cytoplasmatic proteins became strongly acidophilic.

What is peculiar and striking in oxychromatic degeneration occur-

ring in yellow fever and what sharply distinguishes it from common necrosis is that acidophilic structures are formed at first *only in some places* of nucleoplasm, while others places remain entirely free from acidophilic structures. Such places correspond to the characteristic clear space interposed between the nuclear membrane and the inclusions.

As regards «stroma», it is simply the linin network laying enclosed by the «ground substance» and whose injury manifests itself by swelling, acidophilia, and wrinkling of the network as well as lysis of the basichromatin particles.

A striking difference noted between the changes presented by the linin network in oxychromatic degeneration of yellow fever and the changes it presents in other retrograde processes (necrosis, necrobiosis) is that only circumscribed portion of the linin network, that enclosed by the ground substance, undergo swelling, acidophilia and lysis. The remaining portion, which can be seen in the clear space around the inclusions, stains generally well; the changes there observed, such as tearing of the network, are obviously less intense than those presented by the structures within the inclusions.

In conclusion, the stroma represents a local alteration of the linin network: its modifications, lysis, acidophilia. swelling are changes usually occurring in retrograde processes.

As regards the nucleolus, it is topographically apart from the inclusions untill advanced stages of its development.

The facts already known suggest that yellow fever inclusions represent simply a circumscribed necrosis of the nucleoplasm and of the linin network which interests only some of its constituents while other are apparently more or less preserved.

Indeed, while more or less marked changes do occur in nucleoplasm, the nuclear membrane shows only swelling, sometimes slight, of it basichromatin, nucleolar changes being likewise not marked in the early stages of development of yellow fever inclusions.

Therefore, the study of fixed and stained preparations shows that the changes within the nucleus of hepatic cells where yellow fever inclusions are developing present some general characteristics such as swelling, lysis and acidophilia recognised in common necrosis. Such changes, however, are in the first stages, more marked, and more advanced in some nuclear constituents, or to be specific, only in some portions of a few nuclear constituents, while other portions of these same constituents as well as other nuclear elements do not present such necrotic changes.

The informations just mentioned strongly suggest a «partial necro-

sis of the nucleus», viz., a necrosis which develops at first in some nuclear constituents while other constituents are more or less preserved.

What kind of information, on the other and, is obtained when yellow fever inclusions are observed in fresh and vitally stained cells ?

In respect of this it will be useful to remember Langeron's remarks about the limitations which shall be considered by the observer when he examines fresh and vitally stained cells.

«Les colorations vitales permettent de démontrer la réalité de l'existence de certaines inclusions cellulaires qui pourraient être prises pour des précipités colorés, autrement dit, pour des artifices de préparation. Cette existente réelle ne soit arrêtée... Il faut savoir en outre que, *parmi les inclusions cellulaires, tout ce qui se colore n'est pas vivant:* des pigments divers et des cadavres de bactéries se colorent souvent très intensement... La valeur des colorations vitales est très contestable et très contestée. Des techniciens de premier ordre, comme Galeotti, Lee, Mayer, arrivent à conclure que les résultats obtenus ne constituent pas de véritables colorations. Le colorant peut diffuser dans la cellule vivante, mais ne produite pas une véritable teinture. *Généralement le noyau, et particulièrement la chromatine, ne se colorent pas; si la coloration se produit, c'est que la cellule est morte*». (The italics are ours).

The comparison of these informations with the careful description given by Cowdry and Kitchen of yellow fever inclusions seen in fresh and vitally stained cells is rather favourable than inconsistent with the view of a partial necrosis of the nucleus which would be one explanation for the so-called «intranuclear inclusions». Some points of Cowdry and Kitchen's description will be quoted here:

«That the inclusions are present as such in the living animal and do not in any sense represent the coagulating action of the fixative is shown by the ease with which we have been able to study them in liver cells quickly removed from a chloroformed animal and examined in physiological salt solution. The addition of a supravital stain is not even necessary, since the refractive index of the individual particles is sufficiently different from that of the surrounding nuclear substance to render them easily visible with both direct and obliquous illumination...». «*The particles became tinged when a trace of eosin is added to the salt solution, and are colored more intensely than any other elements in the cell when a little phloxin red is applied in the same way.* [1] In such supravital preparations they may be studied with care and the details of their morphology and topography can be distinguished rather better than in fixed and stained preparations, particularly if a binocular microscope giving perspective is employed. It is readily seen by focusing up and down through entire nuclei that clumps of particles which in thin sections appear to be isolated, are, in reality, often in contact with one another. Frequently there is a central mass, from which clumps of particles stretch out like arms... No indications have been observed of independent motility or of multiplication by division, nor have we detected any increase in

[1] The italics are ours.

size of the particles through accretion or condensation of further materials on, grade down past the border line of visibility, nor are there any specially large ones».

«The intranuclear inclusions... can be stained supravitally by dissolving small amounts of various dyes in the salt solution in which the cells are to be examined. They are tinged with eosin, methylene blue, and neutral red *and are colored more intensely than any other elements in the cell* [2] when phloxin red is applied in this way».

«The solubilities of the inclusions can likewise be tested in the fresh state without the addition of any dye.

... After this dilution with the saline solution the effective concentration of acetic acid is only about 0.05 per cent. The inclusions are dissolved apparently the moment that the acetic acid gains access to them, not one by one but *en* masse. The nucleolus disappears a few second later...». (Cowdry and Kitchen, 1929 and 1930).

Some details of Cowdry and Kitchen's description, such as «the uniformity in size of the particles is noteworthy» and «clumps of particles which in thin sections appear to be isolated, are in reality, often in contact with one another. Frequently there is a central mass, from which clumps of particles stretch out like arms...» are very consistent with our description in fixed and stained preparations of a stroma within the inclusions which will be formed by linin network containing basichromatin particles.

On the other hand, the reported staining of inclusions in living cells with phloxin red more intensely than any other elements in the cell suggest local death or necrosis circumscribed to some elements of the cell.

In conclusion, we can state that many facts of observation suggests while other are not inconsistent with the assertion that in liver cells of *M. rhesus* monkeys injected with yellow fever virus and of human cases of yellow fever there occurs a necrosis which in the first place and for sometime, affects only determined constituents of the nucleus while other constituents are apparently preserved. It will be a partial necrosis of the nucleus.

As a working hypothesis we may admit that in filtrable and ultramicroscopic viruses diseases where characteristic «cellular inclusions» are seen, a peculiar retrograde process takes place which we have termed «*meronecrosis*» (from *meros*—part necrosis).

«Meronecrosis» is a necrosis which affects neither a single and isolated cell nor the single and isolated nucleus or cytoplasm of a single cell but only determined constituents either of the nucleus alone (diseases of Lipschütz karyo-oikon group), or of the cytoplasms alone (diseases of the cyto-oikon group), or of both nucleus and cytoplasm (diseases of the cyto-

[2] The italics are ours.

kario-oikon group). The best characteristic of meronecrosis is that while some constituents of nucleus or cytoplasm undergo sometimes fully advanced necrosis, other constituents of nucleus or cytoplasm in the same cell, are, in early stages at least, apparently preserved.

Meronecrosis brings to observation cellular constituents ordinarily inapparent within the cell and originating probably in a great part from constituents of the cell itself. Another characteristic of meronecrosis, distinguishing it in each disease, is its affinity or specificity not only for peculiar kind of cells but likewise for peculiar structures inside the cell viz., nucleoplasm in yellow fever, nucleoplasm and nucleolus in herpes, neurofibrils and chrondrioma in rabies, etc.).

We agree that, after all, the hypothesis of «meronecrosis» is an affair of terms.

It looks, however, very convenient to the pathologist who will better understand the specific changes in virus diseases on the basis of a particular case in general retrograde processes which are familiar to him than as «intracellular inclusions», as bodies of undetermined nature or as chlamydozoa.

In nosology, the hypothesis of meronecrosis clears the relations between such dissimilar diseases as rabies, yellow fever and *herpes febrilis* which are included in the same group: meronecrosis is not a retrograde process which affects indifferently a great number of cells; instead of that, it is highly specific, affecting in some cases only ganglion cells, in other liver cells and in other epithelial cells, giving rise, therefore, to peculiar and very dissimilar clinical symptoms.

Meronecrosis is also consistent with the more accepted conception about viruses, viz., that which admits they are living organisms. Histo and cyto-tropisms are, indeed, a wide-spread character of pathogenic organised beings and meronecrosis is surely and highly restrained retrograde process interesting only a few tissues in each case, and then, a great number of cells at the same time (over 90 per cent of hepatic cells in some *Macacus rhesus* infected with yellow fever virus).

Finally, it is curious to remark how it suits the well established fact that successful cultures of viruses *in vitro* are only possible when living animal tissues or cells are added: growing and multiplication of such class of living organisms would be accomplished only within living cells and in peculiar sites of the cell, in one case the cytoplasm, in other the nucleus, in other both cytoplasm and nucleus. In respect to this, Rivers, Haagen and Muckenfuss'method of studying virus infection and virus immunity in tissue cultures, offers interest. These authors, having succeeded in cultivating the virus of vaccine and herpes febrilis virus in infected rabbit cor-

neas cultivated in vitro, adopt as a criterion for stating a positive result, the occurrence of characteristic vaccinal and herpetic specific changes. They have established that the culture of vaccine and herpetic virus by their method is regularly associated to the formation of characteristic inclusions on the living cells of the culture media.

Degeneration and necrosis are usually associated with injuries acting from without upon the cell, such as toxines, circulatory changes (local anemia, hyperemia) affecting normal cell activity. This would explain the wide spread incidence of such retrograde processes and their general appearance everywhere.

Meronecrosis, on the contrary, would be independent of such general causes and produced by injuries acting within the cell, possibly the growing and multiplication of the living organism itself. This would explain the highly specific distribution of the retrograde process in this case and the fact that only some components of the nucleus or of the cytoplasm connected with that peculiar injury undergo necrosis while others are apparently preserved. It may be that nucleoproteins originating from nucleoplasm and linin network of hepatic cells are a favorable culture media for yellow fever virus, while for herpetic virus nucleoproteins arising from nucleolus are likewise in demand. As a rule, cells presenting meronecrosis or inclusion bodies, remain alive for a more or less considerable lenght of time.

GENERAL SUMMARY OF RESULTS

1—Within the nucleus of liver cells from *Macacus rhesus* and *M. cynomolgus* monkeys (figs. 13-34) injected with yellow fever virus as well as in human cases of yellow fever (figs. 61-65 and 68-69), it occurs a retrograde process refered in literature as «oxychromatic degeneration» which process is remarkably intense in most injected monkeys while it is rather scarce in human material available at autopsy.

This change is closely related to the injury produced by yellow fever virus itself being in this sense the only change really specific in yellow fever.

No other changes either cytoplasmic or extracellular granules could be found in our material bearing an evident relation to yellow fever virus.

Therefore, yellow fever is a filtrable virus disease forming characteristic «cellular inclusions» only within the nucleus. It falls in the karyo-oikon group of Lipschütz'classification together with *herpes febrilis,* virus III disease, chicken-pox, submaxillary disease, etc.

As is the case with most virus diseases forming intracellular bo-

dies, yellow fever inclusions are developed predominantly in a few kind of cells, but, when present they frequently are found in a great number of elements. Sometimes are found in a great number of elements. Sometimes over 90 per cent of liver cells in injected monkeys presented inclusions. In humans the phenomenon could not be observed in our material, apparently in account of the stage of disease in which it was available for study and of peculiar conditions of yellow fever virus in man.

Questionable inclusions were also found in infected *cynomolgus* and *rhesus* monkeys within the nuclei of cells from the cortical layer of suprarenals (figs. 37 and 40).

2—Liver changes were markedly different in human cases of yellow fever and in *rhesus* monkeys injected sometimes directly with blood from the same yellow fever patients.

Those differences being found in a rather homogeneous material as regards the strain or strains of virus concerned led us to admit that the difference in the incidence of inclusions in monkeys and humans we had the opportunity to observe at Rio de Janeiro, Brasil, as well as the recognised differences regarding the presence of virus in blood and tissues in both animals, were by no means dependent from the strain of virus employed nor from the number of passages of yellow fever virus through *rhesus* monkeys, but rather from the kind of animal considered.

Though the yellow fever patients listed in table VIII pertained to different nationalities and though possibly several strains of virus were concerned in the 1928 epidemy at Rio de Janeiro, Brazil, we are in a position to affirm that the yellow fever strain or strains of virus that infected man during the mentioned epidemy were weak inclusion formers in man. The human case in which inclusions were more numerous presented several circumstances not usually combined in human cases coming to necropsy: the patient was a girl four years old dying 40 hours after the appearance of the first symptoms and necropsy was performed 30 minutes after death.

But the same strain or strains of virus when injected sometimes directly with the blood of patients into rhesus monkeys revealed themselves strong inclusion formers in this animal.

Toxic and circulatory changes such a congestion, fatty degeneration and necrosis were also distinctly different in monkeys and humans and in general way more marked in man than in *rhesus* monkeys injected with the brazilian yellow fever strains isolated during 1928 epidemy at Rio de Janeiro, Brazil.

Inclusions were found in most preparations from three human cases

of yellow fever only within scattered non necrotic liver cells usually surrounding portal veins. It is curious to remark that when one cell with yellow fever inclusion is for the first time discovered in one preparation, the search will soon demonstrate other inclusions—bearing cells in the vicinity of this one, although never contiguous ones. Such «nests» of inclusion-bearing cells were, however, not always easily found in preparations from different portions of the same liver and this is in accordance with topographical differences mentioned by Oskar Klotz (1928) and by Hudson (1928) in other hepatic changes.

3—Oxychromatic degeneration in yellow fever is a retrograde process in which are involved normal nuclear constituents as seen in fixed and stained cells.

These components are oxychromatin, the linin network and basichromatin particles pertaining to this network. It is probable that several nucleoproteins beyond oxychromatin are formed from nucleoplasm in abnormal conditions and mix themselves with oxychromatin contributing to form the intranuclear acidophilic albumin of the inclusion.

Linin network and basichromatin particles undergo respectively, tearing, swelling and lysis (figs. 69, 71 and 72); they stain less and less distinctly so that some basichromatin particles do not stain at all (lysis); notwithstanding, a linin network can be evidenced with the inclusion even in advanced stages of oxychromatic degeneration (fig. 72).

The chief characteristic, however, of this specific retrograde process in yellow fever is his strict limitation to a few nuclear constituents, at least in the first stages of development (figs. 14-20). Thus, in such stages, some nuclear constituents such as nucleolus, nuclear membrane and the nucleoplasm situated near nuclear membrane are relatively preserved (figs. 16 and 70), while acidophilia, swelling and lysis are yet very marked on the central part of nucleoplasm.

4—In typical yellow fever inclusions (figs. 69 and 71) it is possible to consider a «ground substance» and a «stroma».

The ground substance corresponds, probably, to several nucleoproteins beyond oxychromatin originating themselves as a result of an injurious agent upon nucleoplasm.

These nucleoproteins do not stain with methylgreen, with Unna's methylene blue, with hemalaun and do not contain thymonucleinic acid as shown by Feulgen's «Nuclealfärbung». They stain pink-carmine with bordo and pink with eosin and phloxin red. They represent, therefore, a basic nuclear albumin which to a certain extent, at least, is probably a new substance formed within the nucleus in the same manner as hyalin,

amyloid and mucin are new substances accumulated within or without the cells as a result of various injurious influences.

Portions of the linin network on which the above mentioned acidophilic nucleoproteins accumulate, undergo more or less marked changes (tearing, swelling, lysis) and constitue the «stroma» of the inclusion (figs. 69, 71 and 72).

The stroma is better seen in bordo and hemalaun stained preparations, because the ground substance is not so deeply stained there than in eosin or phloxin red stained preparations.

In a general way, the morphologic details just refered are more easily appreciated in preparations examined with Leitz'Oc. periplan. 25×, Obj. imm. 1/12 100× and the white light of a Leitz' «Speziallampe» «Nitra» (6 volts, 6 amp.). Variations in the intensity of illumination which are easily obtained either manoeuvring the illuminator or the diaphragm-iris are a great help in fixing such delicate details. In the above mentioned optical conditions, it is in most cases possible to evidence more or less well preserved portions of linin network (figs. 67, 69 and 71) within the characteristic clear space or halo that surrounds the inclusion and separates it from nuclear membrane. Accurate observation shows, moreover, that relativelly well preserved remnants of linin network placed without the inclusion are inserted upon nuclear membrane (figs. 69 and 71) and on the other hand are in direct continuity with the stroma of the inclusion. It may be that inclusions are maintained fix in the central part of the nucleus in part, at least, by those well preserved or non necrotic portions of the linin network.

A characteristic change in nuclei of liver cells with yellow fever inclusions is the increase in volume, very marked in some instances (figs. 31, 34 and 72) of the chromatin placed near or deposited upon the nuclear membrane.

The condition is refered in literature as an «aposition» or «margination» of nuclear chromatin over the membrane. In other words, it is generally accepted that portions of nuclear chromatin became marginated upon the nuclear membrane.

This is an improbable assertion, in our opinion, and we prefer to consider the peculiar aspects of nuclear chromatin represented in figs. 31, 34 and 72 as a local *swelling* of the basichromatin that in normal conditions exists near or upon the nuclear membrane.

Such local swelling of chromatin over the nuclear membrane must not be regarded as forcefully associated with intranuclear inclusions in

virus diseases. Indeed, Pianese represents in Taf. IV, fig. IV, very similar nuclear changes as occurring on the nucleus of a tumor cell.

5—The appearance of acidophilic granules (fig. 18) presented sometimes by yellow fever inclusions when observed in preparations stained with several methods but specially in those stained with eosin and when Leitz Oc. periplan 4× or 8× and Obj. imm. 1/12 100× is used, is to a certain extent a fictitious one as shows the observation of the same structures with Leitz' Oc. periplan 25×, Obj. imm. 1/12 100× and Leitz' «Speziallampe» (figs. 68 and 69).

When observed in the last mentioned optical conditions, well developed or typical yellow fever inclusions, either in infected monkeys (fig. 71) or in man (fig. 69) are not formed by clumps made up of acidophilic particles which remain the same size while the clumps increase in size.

In all cases, whichever the stage of development considered, the inclusions are formed by an acidophilic ground substance (figs. 69, 71 and 72) (and not by acidophilic particles) and a stroma. The particles seen within the inclusions are basophilic particles (figs. 16, 62, 65, 68) corresponding in every respect to basichromatin particles related to the linin network (figs. 69, 71 and 72); some of them undergo lysis and the linin network is somewhat retracted (fig. 72) in advanced stages.

The fictitious aspect of acidophilic granules presented by yellow fever inclusions in eosin stained preparations, when examined with relatively low magnification, is probably due to the great luminosity that in such optical conditions and in strongly illuminated microscopic field presents the ground substance as compared and contrasting with the more indistinctly and deeply stained and delicate meshes of the linin network within which it is placed.

6—Marked changes, specially in oxychromatin and acidophilic nucleoprotein are found in liver cells of yellow fever patients beyond intranuclear inclusions (table VIII).

In an attempt to distinguish between such confusing changes we have given provisory terms to each abnormal nuclear aspect we considered as sufficiently constant as to correspond to a peculiar change. Thus we have considered «erythrocyte-shaped granules», «acidophilic particles», etc.

While in 20 human controls (table IX), erythrocyte-shaped granules were found in 6, acidophilic particles (oxychromatin ? fig. 56) in 5, and multiplicity of nucleoli in but one, in 17 yellow fever cases (table VIII), erythrocyte-shaped granules (figs. 57, 58 and 60) were present and

sometimes very abundant in 10, acidophilic particles (fig. 59) in 10 and multiplicity of nucleoli (figs. 54 and 59) in 10.

The presence within the interkinetic nucleus of hepatic cells of numerous nucleoli of different size (figs. 54 and 59), all of them showing in phloxin red and toluidin blue preparations the structure of true amphinucleoli is a striking feature in yellow fever while not common in other human diseases (tables VIII and IX).

BIBLIOGRAPHY

ARAGÃO, H. de B. 1929 a—Modernas acquisições sobre a febre amarella experimental. Archivos de Hygiene *3*, 5.

ARAGÃO, H. de B. 1929 b—Febre amarella experimental no Brasil. Brasil Medico, *43*, 849.

BARNARD, J. E. 1930—Ina discussion on «Ultramicroscopic viruses». Proc. Roy. Soc., Series B, *104*, 537.

COWDRY, E. V. 1928—Intracellular pathology in virus diseases in Filtrable Viruses; edited by T. M. Rivers. Baltimore.

COWDRY and KITCHEN, S. F. 1929—Intranuclear inclusions in yellow fever. Science, *69*, 252.

COWDRY and KITCHEN, S. F. 1930—Intranuclear inclusions in yellow fever. The Amer. Jour. of Hyg., *11*, 227.

DAVIS, N. C. and BURKE, A. W. 1929—Studies on South American yellow fever virus. I. The origin of the strains in use at the Yellow Fever Laboratory in Bahia, Brasil. Jour. Exp. Med., *49*, 975.

DAVIS, N. C. and SHANNON, R. C. 1930—The location of yellow fever virus in infected mosquitoes and the possibility of hereditary transmission. The Amer. Journ. of Hyg., *11*, 335.

GOODPASTURE, E. W. 1925 a—Intranuclear inclusions in experimental herpetic lesions of rabbits. Amer. Jour. of Path., *1*, 1.

GOODPASTURE, E. W. 1925 b—A study of rabies, with reference to a neural transmission of the virus in rabbits, and the structure and significance of Negri bodies. Amer. Journ. of Path., *1*, 547.

HINDLE, E. 1929 a—An experimental study of yellow fever. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., March., *22*, 405.

HINDLE, E. 1929 b—In a discussion in «Ultramicroscopic viruses». Proc. Roy. Soc. Series B, *104*, 537.

HINDLE, E. and STEVENSON, A. C. 1929—Oxychromatic nuclear inclusions in yellow fever. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., June, *23*, 3.

HOFFMANN, W. H. 1929 a—in Kolle, W., Kraus, R. u. Uhlenhuth, P.—Hand. d. pathog. Mikroor., Bd. VIII, Lfg. 32.

HOFFMANN, W. H. 1929 b—Einschlüsse in den Leberkernen beim menschilichen Gelbfieber. Arch. f. Schiffs u. Tropen-Hyg., *33*, 411.

HOFFMANN, W. H. 1930—On the nature of the inclusion bodies in yellow fever. Medical Journal and Record, March. 19.

LANGERON, M. 1916—Précis de microscopie Masson & Cie., Paris.

MARTIN, C. 1929—In a discussion «Ultramicroscopic viruses». Proc. Roy. Soc., Series B, *104,* 537.

PENNA, O. e FIGUEIREDO, B. de 1929—Contribuição ao estudo da histopathologia do figado na febre amarella. Folha Medica.

PETTIT, A. 1929—Virus amaril. Biologia médicale, 19, 337.

PIANESE, G. 1896—Beitrag zur Histologie und Aetiologie des Carcinoms. Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Pathol., Suppl. Hefte I.

PRENANT, A., BOUIN, P. et MAILLARD, L. 1904—Traité d'Histologie, Tome I. Paris.

RIVERS, T. M., HAAGEN, E. and MUCKENFUSS, R. S.—1929 a—A method of studying virus infection and virus immunity in tssue cultures. Proc. of the Soc. of Exper. Biol., and Med., *26,* 494.

RIVERS, T. M., HAAGEN, E. and MUCKENFUSS, R. S. 1929 b—Development in tissue cultures of the intra-cellular changes characteristic of vaccinal and herpetic infections. Jour. of exper. Med., *50,* 665.

ROCHA LIMA, H. da—1912.—Zur pathologischen Anatomie des Gelbfiebers. Verh. d. deut. path. Ges., *15,* 163.

ROCHA LIMA, H. da 1929—Sobre a anatomia pathologica da febre amarella. Folia clinica et biologica, *1,* 4.

SAWYER, W. A., LLOYD, W. D. M., and KITCHEN, S. F. 1929—The preservation of yellow fever virus. Jour. Exper. Med., *50,* 1.

STOKES, A., BAUER, J. H. and HUDSON, N. P. 1928—Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. Amer. Jour. Trop Med., *8,* 103.

TREILER, M. 1930—Susceptibility of white mice to the virus of yellow fever. Science, *71,* 367.

TORRES, C. M. 1928 a—Inclusions nucléaires acidophiles (dégénérescence oxychromatique) dans le foie de *Macacus rhesus* inoculé avec le virus brésilien de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol., *99,* 1344 (Séance du 25 juillet de la Soc. brés. e Biol).

TORRES, C. M. 1928 b—Inclusions intranucléaires et nécrobiose chez *Macacus rhesus* inoculé avec le virus e la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol., 99, 1655 (Séances des 15 et 29 aout, 14 et 26 septembre de la Soc. Brés. de Biol.).

TORRES, C. M. 1928 c—Dégénérescence oxychromatique dans le foie de *Macacus rhesus* et *M. cynomolgus* accompagnant les lésions typiques de la fièvre jaune expérimentale; son absence dans le foie de Singes non inoculés. Ibd., 1660.

TORRES, C. M. 1928 d—Sur la dégénérescence oxychromatique du foie chez les Singes inoculés avec le virus de la fièvre jaune. Ibid., 1669.

TORRES, C. M. 1928 e—Sobre a «necrose salpicada» do figado na febre amarella. Sciencia Medica, nº 8, Agosto.

TORRES, C. M. 1928 f—Sobre a degeneração oxychromatica da cellula hepatica como lesão caracteristica na infecção experimental pelo

virus brasileiro da febre amarella. Brasil Medico, nº 36, 8 de Setembro.

TORRES, C. M. 1928 g—Inclusões nucleares acidophilas (degeneração oxychromatica) na febre amarella experimental. Sciencia Medica, 1928, nº 9, Setembro.

TORRES, C. M. 1928 h—Sur l'importance de la dégénérescence oxychromatique des cellules du foie chez *Macacus rhesus* inoculé avec le virus Brésilien de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol., *99*, 1671 (Séances des 15 et 29 août, 14 e 26 septembre 1928 de la Soc. brés. de Biol.).

TORRES, C. M. 1928 i—Alterações nucleares das cellulas do figado nas infecções de *Macacus rhesus* e *M. cynomolgus* pelo virus da febre amarella. Mem. Inst. O. Cruz, Suppl., nº 2, 15 Outubro pg. 55.

TORRES, C. M. 1928 j—Etude par le procédé de Goodpasture et la réaction de Feulgen, des inclusions nucléaires de la fièvre jaune expérimentale. C. R. Soc. Biol., *100*, 966 (Séance du 26 décembre de la Soc. brés. de Biol.).

TORRES, C. M. 1929 a—Intranuclear inclusions in experimental yellow fever. Mem. Inst. O. Cruz, Supp., nº 6, março, pg. 69.

TORRES, C. M. 1929 b—Sur les inclusions nucléaires dans la fièvre jaune expérimentale (virus brésilien et africain). S. R. Soc. Biol., *101*, 951 (Séance du 27 mars, de la Soc. brés. de Biol).

TORRES, C. M. 1929 c—Inclusões nucleares na febre amarella. Brasil-Medico, 6 de Abril.

TORRES, C. M. 1929 d—Altérations nucléaires des cellules du foie chez les Singes inoculés avec le virus brésilien et africain de la fièvre jaune. C. R. Soc. Biol., *101*, 959 (Séance du 24 avril de la Soc. Brésil. de Biol.).

TORRES, C. M. 1929 e—Morphologie des inclusions hépatiques dans la fièvre jaune humaine. C. R. Soc. Biol., *102*, 410 (Séance du 13 júin de la Soc. brés. de Biol.).

TORRES, C. M. 1929 f—Altérations du nucléole des cellules du foie dans la fièvre jaune. *Ibid.*, 414 (Séance du 27 juin de la Soc. brés. de Biol.).

UNN, P. G. 1928—Histochemie der Haut, 1928, F. Deuticke, Leipzig.

DESCRIPTION OF PLATES XXVIII—XXX

Figures 1—65 and figure 68 were made with the aid of Zeiss ocular compens. 6, objective imm. homog. 1/12 and camera lucida; figures 66, 67 and 69-72, with the aid of Leitz periplan. ocular 25 B, objective A port, 1.30, 100×, using as illuminator Leitz «Speziallampe» Nitra (6 volts, 6 amp.).

Figures 1—8 and 54, 64 and 67 are reproduced in the colors secured after staining with basic fuchsin and Loeffler's methylene blue; the same staining was employed il figures 9-11 and 63, the sections being treated, after staining and deshydration, with carbol-xylol-oil of cloves. In figures 12-37, 40-48, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 68, 69, 71 and 72 the staining used was Delafield's haematoxylin or Meyer's hemalaun and

eosin, in figure 49, Feulgen's «Nuclealfärbung», in figures 50, 51, 66 and 70, phloxin red and toluidin blue, in figures 38 and 65, bordo and hemalaun, in figure 39, Pappenheim-Unna's methyl green-pyronin. The fixative employed was Zenker's fluid, except in figures 57, 61 and 62 in which it was formalin used alone.

PLATE XXVIII

Figures 1 and 2: normal liver cells from *M. rhesus* 2638 uninoculated; nuclear membrane and chromatin are stained blue, nucleoli red, cytoplasm bluish pink.

Figures 3-11: liver cells from *M. rhesus* Ar. Tx. (table VII) injected with yellow fever virus. Figures 3, 4 and 5 show early stages of development of inclusions. Figure 6 represent a typical inclusion («butterfly-like» figure) stained blue violet and nucleolus red. Figure 7 show another usual aspect in typical yellow fever inclusions; the inclusion stains blue violet and nucleolus red. In figures 5 and 6, the linin network and basichromatin particles can be seen within the inclusions. Figures 6 and 7 show swelling of basichromatin situated on nuclear membrane. The nucleus is slightly increased in volume in figures 4-7. Figure 8 shows advanced stage of oxychromatic degeneration.

PLATE XXIX

Figures 13—25 show inclusions in rhesus monkeys injected with Brazilian strains of yellow fever virus and figures 26—34, in *rhesus* monkeys injected with West African strain Asibi.

Figure 12 represents a liver cell of *rhesus* monkey 13 C. Mn. injected with Noguchi's medium inoculated with virus (several passages) and died on the 48th day after inoculation. Normal structure, excentric nucleoli, well stained nuclear basichromatin and membrane, no oxychromatin being recognisable within the nucleus.

Figure 13 represents early stage of oxychromatic degeneration in a liver cell of *rhesus* 8 Ar. (table I); well circumscribed acidophilic substances are seen in two places of nucleoplasm, while the linin network, the nuclear membrane and the nucleolus are apparently well preserved.

Figures 14—16 and 18—23 show typical inclusions in *rhesus* Ar. Tx. (table VII). Well stained basichromatin particles are seen either within the inclusions or in the clear space that surrounds it in figures 15, 16, 18, 19 and 20. In figures 21, 22 and 23, partial lysis of basichromatin has, in all probability, occurred.

In figures 17, 24 and 25, marked swelling of basichromatin on nuclear membrane associated with presence of inclusions in liver cells from *rhesus* 8 Ar. (table I).

Figures 27, 28, 32 and 33 represent liver cells from *rhesus* 62 C. Mn. (table VI), figures 29, 30, 31 and 34, from *rhesus* 58 C. Mn. (table VI) and figure 26, from *rhesus* 57 C. Mn. (table VI).

Figures 35, 36 and 40 show cells from the cortical layer of suprarenals in *Maca-*

cus cynomolgus 15 C. Mn. (table III). In figure 35, normal cell, in figure 36, karyolysis of nucleus, in figure 40 a questionable inclusion.

Figures 37 and 41 represent cells from the cortical layer of suprarenals in *rhesus* 8 C. Mn. (table V). In figure 41, basophilia of nucleoplasm.

Figures 42, 46 and 47 show hepatic cells from *rhesus* 24 C. Mn. (table VII), figures 44 and 45, from *rhesus* 8 C. Mn. (table V), figure 43 from *rhesus* Ar. Tx. (table VII).

Pycnosis in liver cell from uninoculated *rhesus* monkey 2655 is illustrated in figure 48.

In figure 49, hepatic cell from *rhesus* Ar. Tx. (table VII), in preparation submitted to Feulgen's «Nuclealfärbung». Within the non stained inclusion, a clear network in some spots of which are seen indistinct granules slightly Prussia blue stained. On nuclear membrane, blue stained particles (chromatin).

Figure 38 shows hepatic cells in *rhesus* 443 Ar. (table IV); not easily interpretable aspect: «empty nuclei ?» artefact ?

Figure 39. Liver cell of *rhesus* Ar. Tx. (table VII); nucleolus stained red, and inclusion is not stained.

Figures 50 and 51 represent liver cells from *rhesus* Ar. Tx. (Table VII) in which is clear the splitting of nucleolar constituents.

In figure 52, acidophilia of cytoplasm without inclusion formation in *rhesus* 14 C. Mn. (table V).

PLATE XXX

Figure 53 shows marked swelling of nucleolus in hepatic cell from human case of yellow fever (case 2488, table VIII).

Figure 54 represents a binucleated liver cell from human case of yellow fever (case 5396, table VIII) with marked increase in the number of nucleoli, some of which corresponds to less than 1/5 of the normal nucleolus. Basophilia of nucleoplasm in human case of yellow fever (case 5406, table VIII) is represent in figure 55.

Figure 56 shows acidophilic substances in nucleoplasm of hepatic cell in a human case of cancer of gallbladder (autopsy 2558, table IX); this nuclear change is distinguishable from true intranuclear inclusions of virus diseases because a typical clear space round the acidophilic substances as well as swelling of basichromatin on nuclear membrane are wanting and the linin network is well preserved.

In figure 57, erythrocyte-shaped granule within hepatic cell nucleus from yellow fever case 2485, (table VIII); the nucleolus is not seen in the drawing. Erythrocyte-shaped granules are represented within hepatic cells nuclei from human cases of yellow fever in figures 58 (case 2530) and 60 (case 5396); in figure 60, «empty nuclei».

In figure 59, nucleoli increased in number and acidophilic material (doubtful inclusion) in nucleoplasm of hepatic cell from human case of yellow fever (case 5397, table VIII).

Figures 61 and 62 show typical inclusions in human case of yellow fever (case 2485, table VIII), figures 63, 64 and 65, typical inclusions in case 5271 and figures 68 and 69, in case 5396.

Figure 69 shows the same nucleus represented in figure 68 as seen with higher magnification. It is to be noted that the inclusion is formed by an acidophilic ground substance (oxychromatin and acidophilic nucleoproteins originating from nucleoplasm under abnormal conditions ?) and by a stroma. Stroma is formed by the linin network and basichromatin particles placed on this network; these particles undergo partial lysis.

Figures 66 indicates a normal nucleus in liver cell from *rhesus* Ar. Tx. (table VII).

Figure 70. Early stages of oxychromatic degeneration. The acidophilic nucleoproteins appears within a few meshes of the linin network, and stains sometimes pink, sometimes a light shade of orange. *Rhesus* Ar. Tx. (table VII).

Figure 71. Well developed inclusion in liver cell from *rhesus* Ar. Tx. (table VII). The stroma may be clearly distinguished within the inclusion and in direct continuity with the linin netword situated on the clear characteristic halo.

Figure 67. The stroma is very distinct within the inclusion and in continuity with the linin network more or less preserved outside the inclusion. Liver cell from *rhesus* Ar. Tx. (table VII).

Figure 72 Adavanced stage of oxychromatic degeneration in liver cell from *rhesus* 58 C. Mn. (table VI). Within the inclusion it is to be noted a stroma which corresponds to a wrinkled slightly acidophilic linin network and basichromatin particles undergoing partial lysis. Marked swelling of basichromatin on the nuclear membran.

Sôro-virus vaccinação na febre amarella (*)

pelo

DR. HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO

(*Chefe de Serviço*)

A solução do problema da vaccinação contra a febre amarella tem uma grande importancia pratica, não só como meio de protecção individual como pelo muito que póde contribuir para tornar mais facil e economica a prophylaxia da molestia. Assim, não é para admirar a somma consideravel de esforços que vêm sendo feitos para se encontrar um methodo seguro que traga solução util e efficaz para tão importante questão. (Aragão H. B. Brasil Medico 17-1-31).

Os processos até agora usados podem ser classificados em 3 grupos diversos, a saber:

1º.—Immunização passiva obtida no homem ou no animal por meio da injecção de sôro de um individuo curado da febre amarella ou de um macaco immunizado contra o virus.

2º.—Immunização activa por meio de vaccinas constituidas por emulsões de orgãos de macacos infectados, após prévio tratamento do material por meio de um antiseptico apropriado; formol, chloroformio, acido phenico, etc.

3º.—A sôro-virus-vaccinação, isto é, uma vaccinação activa obtida pela inoculação de sôro de individuo ou animal immunizado contra a febre amarella e de virus desta molestia, devendo esta ser feita 24 horas depois da primeira.

O primeiro methodo, o de immunização passiva por meio de sôro humano ou de animal immune contra a febre amarella, tem sido bastante empregado entre nós, quer para proteger as pessoas que trabalham nos laboratorios com virus amarillico, quer para aquellas que se acham em fócos da molestia e sujeitas á picada de mosquitos infectados. Ascende a mais de 200 o numero de pessoas assim protegidas entre nós, não se tendo

(*) Recebido para publicação a 12 de Fevereiro de 1931.

verificado entre ellas caso algum de febre amarella. A dóse de sôro usada oscillou entre 1 a 4 c.c.

O methodo de vaccinação contra a febre amarella por meio de vaccinas preparadas com emulsões de orgãos de macacos é o que teve até agora mais largo emprego na pratica e experiencia de laboratorio.

O methodo foi inaugurado por Hindle e usado tambem por nós, por Pettit, Lemos Monteiro e outros pesquisadores. Já anteriormente a commissão franceza havia verificado que o sôro aquecido de um amarellento, nos primeiros dias da molestia, isto é, quando ainda contém o virus, tinha acção vaccinante quando injectado num individuo não immune. As vaccinações com orgãos de macacos infectados tiveram, não só no laboratorio como na pratica, uma experimentação bastante ampla.

A principio o resultado do seu emprego no laboratorio e no homem foi bastante encorajador, mas depois que seu uso foi sendo feito em maior escala, revelou-se sua acção um tanto irregular. Nuns casos a immunização obtida foi muito bôa, ao passo que noutros deu falhas, attribuiveis á insufficiencia da dóse usada de 2 c.c. (no homem) e a possiveis variações das propriedades immunizantes das differentes emulsões usadas. As vaccinações humanas entre nós, por este processo, durante o surto epidemico de 1928-1929, elevaram-se a cerca de 25 mil.

Como este methodo de vaccinação ainda continúa em estudos de laboratorio, é possivel que novas technicas e maior experiencia venham tornar ainda mais efficiente sua acção, tanto no animal como no homem.

A sôro-virus vaccinação é um methodo de immunização contra a febre amarella que estamos ensaiando ha algum tempo, e que julgamos, pelas experiencias até agora feitas, ser capaz de dar resultados seguros e uteis na pratica.

Para se fazer a vaccinação por este processo são necessarios dois elementos: um sôro dotado de propriedades immunizantes contra a febre amarella e o virus amarillico. O sôro a ser usado tanto póde ser de um homem curado de febre amarella como de um macaco tambem curado da molestia. Estabelecido o processo de um modo pratico, é de todo recommendavel a hyper-immunização dos fornecedores de sôro (o homem ou macaco), por meio de successivas inoculações de sangue virulento ou picada de mosquitos infectados.

O virus necessario para o complemento da immunização, por este

processo, deve ser o que existe no sangue de macacos infectados, e que, sendo deseccado e mantido em baixa temperatura, se conserva inalterado por cerca de um anno. Desta fórma o virus póde ser facilmente transportado para qualquer ponto em que deva ser usado, sendo apenas necessario diluil-o, na occasião do emprego.

A realização pratica do processo é da maior simplicidade, pois consiste em se injectar 1 a 2 c.c. de sôro no macaco e 24 horas depois 0,1 c.c. de virus (sangue em natureza ou uma diluição correspondente de sangue secco) [1]. No homem a dóse de sôro a usar deve ser de 4 c.c., devendo a de virus não exceder a 0,1 c.c., que no macaco se revelou perfeitamente supportada. Doze dias depois da sôro-virus vaccinação recommenda-se repetir a inoculação de mesma quantidade de virus (0,1 cc.) para reforço da primeira immunização. Nossa experiencia demonstrou que, mesmo mezes depois do emprego da sôro-virus vaccina, a immunização dos macacos é bastante segura, pois, inoculando-se-os com 0,1 a 1 cc. de sangue virulento, não apresentaram reacção alguma.

A realização pratica do processo não apresenta portanto nenhuma difficuldade insuperavel, sendo apenas necessario que, no caso de ser ampliado o seu uso, se organize um corpo de doadores de sôro, como já existem em muitos paizes para a prophylaxia do sarampo, etc., e um serviço de immunização de macacos com o mesmo objectivo. O virus sob a fórma de sangue deseccado é de facilima obtenção em larga escala, sem difficuldade maior, dada a pequena quantidade em que é usado.

A technica da sôro-virus vaccinação contra a febre amarella resume-se no seguinte: —1°. Inoculação num *rhesus* de 1 a 2 cc. de sôro immunizante humano ou de macaco immune contra a febre amarella (para o homem 4 cc.).—2°. Inoculação, 24 horas depois, tanto no animal como no homem, de 0,1 cc. de sangue virulento em natureza ou a quantidade correspondente de uma diluição de sangue secco.—3°.Inoculação 12 dias depois, no animal ou no homem já submettido á sôro-vaccinação, de 0,1 cc. de virus para consolidação da immunização obtida.

Estabelecida desta fórma a technica da sôro-virus vaccinação contra a febre amarella, vejamos as experiencias em que nos baseamos para apresentar o processo como aqui o fazemos.

EXPERIENCIA I

Rhesus 160.—Inoculado em 19-IX-28 com 2 cc. de sôro de um menino (H.) suspeito de ter tido febre amarella (prova de protecção) e no

[1] Um centimetro cubico de sangue reduz-se, pelo deseccamento, a 0,165 grs. de material secco, e 0,1 cc. de sangue a 0,016 grs.

dia seguinte com 0,1 cc. de uma emulsão de figado virulento de um macaco *rhesus*. Temperaturas: 19-IX, 39°; 20-IX, 38°,8; 21-IX, 39°,5; 22-IX, 39°; 23-IX, 38°,7; 24-IX, 39°,4; 25-IX, 39°; 26-IX, 39°; 27-IX, 39°,4; 28-IX, 39°,5; 29-IX, 39°,2; 30-IX, 39°,3. A seguir, o animal continuou sempre bem, confirmando a prova de protecção realizada ter sido de febre amarella o caso então em estudo. A observação do animal é interrompida e em 2-IV-29, isto é, mais de 6 mezes depois, é elle inoculado com 1 cc. de sangue virulento do *rhesus* 359 que matou outros macacos. Temperaturas: 2-IV, 39°,3; 3-IV, 39°,4; 4-IV, 39°,3; 5-IV, 39°,5; 6-IV, 39°,5; 7-IV, 39°,5; 8-IV, 39°,2; 9-IV, 39°; 10-IV, 39°,8; 11-IV, 39°; 12-IV, 39°,6. O animal continuou a passar bem, demonstrando assim que a sôro-virus vaccinação inicial lhe conferira uma immunidade muito solida.

EXPERIENCIA II

Rhesus 213.—Inoculado em 23-XI-28 com 2 cc. de sôro de um homem (F.) suspeito de ter tido febre amarella (prova de protecção) e no dia seguinte com 0,1 cc. de uma emulsão de figado virulento de um *Macacus rhesus*. Temperaturas: 23-XI, 39°; 24-XI, 39°,2; 25-XI, 39°,7; 26-XI, 39°,1; 27-XI, 39°; 28-XI, 38°,9; 29-XI, 38°,5; 30-XI, 39°,4; 1-XII, 39°,2; 2-XII, 39°,3; 3-XII, 39°,2. A seguir, o animal continuou a passar bem, confirmando a prova de protecção ter sido de febre amarella o caso então em estudo. Em 8-XII-28 este animal é inoculado com 0,1 cc. de sangue virulento do *rhesus* 212 que matou outros macacos. Temperaturas: 8-XII, 39°,1; 9-XII, 39°; 10-XII, 39°,6; 11-XII, 39°,3; 12-XII, 39°,2; 13-XII, 38°,9; 14-XII, 39°,3; 15-XII, 39°,4; 16-XII, 39°,2. O animal depois desta segunda inoculação de virus sempre passou bem, demonstrando, como o anterior, que a sôro-virus vaccinação inicial lhe conferira uma immunidade segura contra a febre amarella.

EXPERIENCIA III

Rhesus 626.—Inoculado com 2 cc. de sôro do *rhesus* 12 (hyperimmunizado) por via subcutanea em 21-XII-29 e no dia seguinte com 0,1 cc. de sangue virulento do *rhesus* 620. Temperaturas: 21-XII, 39°,1; 22-XII, 39°; 23-XII, 39°,2; 24-XII, 39°,6; 25-XII, 39°,5; 26-XII, 39°,8; 27-XII, 39°,9; 28-XII, 39°,6; 29-XII, 39°,4; 30-XII, 39°; 31-XII, 39°. O animal mantem-se sem alteração até 27-I-30 quando foi inoculado com 1 cc. de sangue virulento do *cynomolgus* 644. Temperaturas: 27-I, 39°,1; 28-I, 39°; 29-I, 38°,8; 30-I, 39°; 31-I, 38°,9; 1-II, 39°,1 2-II, 39°,2; 3-II, 39°,5; 4-II, 39°,5; 5-II, 39°,4; 6-II, 39°,3; 7-II, 39°,5. A 8-II-30 a tempe-

ratura do animal se eleva a 39°,8, no dia seguinte a 39°,9, depois a 40° e assim se mantem até o dia 15-II-30, quando o animal é sacrificado, verificando-se que apresenta broncho-pneumonia, fócos de tuberculose, mas nenhuma lesão de febre amarella, o que demonstra que a immunização pela sôro-virus vaccinação ainda neste caso conferiu ao animal uma immunização completa e segura contra uma inoculação posterior do virus puro.

EXPERIENCIA IV

Rhesus 785.—Inoculado por via subcutanea com 1 cc. de uma mistura de sôro dos *rhesus* hyperimmunizados (ns. 12 e 20) no dia 20-X-30 e no dia seguinte com 1 cc. de uma diluição de sangue secco correspondente a 0,1 cc. de sangue em natureza. Temperaturas: dia 20-X, 39°,2; 21-X, 39°; 22-X, 39°; 23-X, 39°,3; 24-X, 39°,4; 25-X, 39°,5; 26-X, 39°,6; 27-X, 39°,4; 38-X, 39°,6. O macaco não apresentou reacção alguma até 26-XII-30 quando foi novamente inoculado com 1 cc. de uma diluição de sangue virulento secco correspondente a 0,1 de sangue em natureza. Temperaturas: 26-XII, 38°,4; 27-XII, 38°,3; 28-XII, 38°,1; 29-XII, 38°,4; 30-XII, 38°,8; 31-XII, 38°,6; 1-I-31, 38°,4; 2-I, 38°,8. O macaco resistiu, como se vê perfeitamente, a essa nova inoculação de virus, demonstrando assim estar solidamente immunizado.

EXPERIENCIA V

Rhesus 786.—Inoculado por via subcutanea com 2 cc. de uma mistura de sôro de 2 individuos curados de febre amarella em 20-X-30 e no dia seguinte com 1 cc. de uma diluição de sangue secco correspondente a 0,1 cc. de sangue em natureza. Temperaturas: dia 20-X-30, 39°,3; 21-X, 39°,5; 22-X, 39°,3; 23-X, 39°,4; 24-X, 39°,1; 25-X, 39°; 26-X, 39°,2; 27-X, 39°,1; 28-X, 39°,3. Este *rhesus* nenhuma alteração apresentou até 26-XII-30 e nesta data recebeu uma nova inoculação de virus: 1 cc. de uma diluição de sangue secco correspondente a 0,1 cc. de sangue em natureza. Temperaturas: 26-XII, 38°,4; 27-XII, 38°,1; 28-XII, 38°,6; 29-XII, 38°; 30-XII, 38°,5; 31-XII, 38°; 1-I-31, 37°,9; 2-I, 37°,8. Da mesma fórma que o *rhesus* anterior, este macaco resistiu perfeitamente a esta nova inoculação de virus, o que demonstra a solidez da immunidade conferida pela sôro-virus vaccinação inicial.

EXPERIENCIAS DIVERSAS

Além das experiencias acima mencionadas detalhadamente e das quaes se evidencia a vantagem da sôro-virus vaccinação segundo a technica usada, como meio de se obter uma immunização garantida contra a

febre amarella, tivemos occasião de fazer algumas outras com objectivos diversos e que, por não terem importancia maior, aqui mencionaremos resumidamente. São ellas as seguintes:

1º.—Experiencias de sôro-vaccinação usando uma menor quantidade de sôro por via venosa. Em 2 macacos *rhesus* (605 e 606) inoculámos 0,5 cc. de sôro de macaco hyperimmunizado na veia e, 24 horas depois, 0,1 cc. de sangue virulento. Ambos os animaes supportaram a injecção do virus, mas o segundo teve algumas reacções febris, entre 40 e 41 gráos, durante 4 dias, e depois tudo se normalizou. Inoculados os dois macacos 22 dias depois com uma nova dóse de 0,1 cc. de sangue virulento, tiveram elles de novo reacções febris durante alguns dias e em seguida tudo voltou ao normal. Uma nova inoculação no *rhesus* 605, de 2 cc. de sangue virulento, veiu demonstrar que a immunização deste animal era solida, pois elle não apresentou reacção alguma.

2º.—Experiencias feitas com pequenas quantidades de sôro humano e de animal hyperimmunizado contra a febre amarella. Algumas experiencias de sôro-virus vaccinação, feitas usando o sôro em quantidades de 0,01, 0,1 0,5, 1 2 2 cc. com o fim de verificar qual a quantidade minima de sôro que poderia ser usada para proteger e immunizar um *rhesus* contra a febre amarella, demonstraram que os animaes só deixam de apresentar reacção com 1 cc. de sôro. Com 0,5 cc. ainda ha reacções febris e com 0,01 e 0,1 cc. os animaes succumbem á febre amarella. Assim, a dóse util para o macaco deve ser considerada a de 1 cc.; não devendo serem usadas para o homem menos de 4 a 5 cc. de sôro de um individuo curado contra a febre amarella ou de macaco hyperimmunizado.

3º.—Além do sôro humano e de macaco, procuramos verificar si os mesmos resultados poderiam ser obtidos com o uso de sôro de cavallo immune contra a febre amarella, o que traria na pratica grande vantagem; infelizmente, porém, os resultados não foram bons, devido ao fraco poder protector do sôro usado.

4º.—Algumas experiencias foram feitas, substituindo-se as injecções subcutaneas simultaneas dos dois elementos, em pontos diversos do corpo do mesmo animal, ou ainda usando misturas de sôro (0,5 cc.) e virus (0,1 cc.) por via subcutanea. Em ambos os casos os animaes, embora tivessem resistido a inoculações, apresentaram reacções febris, mais ou menos prolongadas, de modo que só talvez com o uso de maiores quantidades de sôro se venha a colher resultado favoravel com este processo.

CONCLUSÕES

Examinando os resultados até agora obtidos com o uso da sôro-virus vaccinação na febre amarella, pensamos poder admittir que o processo é

de facil realização pratica e que confere uma immunização segura aos animaes em que é empregado, e que dará na pratica da vaccinação humana os resultados que delle são esperados.

A facilidade do transporte do sôro e do virus secco virulento asseguram ao processo a possibilidade de seu emprego em qualquer ponto em que se torne necessario este methodo de protecção.

Esperamos que a divulgação do methodo venha concorrer para sua experimentação nos differentes centros de estudo de febre amarella.

Vaccination with serum-virus in yellow fever (*)

by

DR. HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO

(*Chief in Service*)

The solution of the problem of vaccination against yellow fever has great practical importance, not only as a means of individual protection, but also on account of the great part it may contribute to make easy and more economical the prophylaxis of that disease. Therefore, it is not astonishing to see the considerable amount of efforts put forth to discover a sure method which might afford a useful and efficient solution of so important a question. (Aragão H. B. Brasil Medico 17-1-31).

The processes, used up to now, may be classified into 3 different groups, as follows:

1º.—Passive immunization that is obtained, in man or animal, by means of an injection of serum from an individual recovered from yellow fever or from a monkey immunized against the virus.

2º—Active immunization with the aid of vaccines constituted by emulsions of the organs of infected monkeys, after previous treatment of the material with an appropriate antiseptic substance, such as formol, chloroform, carbolic acid, etc.

3º—The vaccination with serum-virus, i. e. an active vaccination obtained by means of inoculation of serum from an individual or animal immunized against yellow fever and inoculation of virus of that disease; the latter has to be made 24 hours after the former.

The first method, that of passive immunization with the aid of human or animal serum, immune against yellow fever, was employed here, by us, in a fair number of cases, either to protect the persons who are working in laboratories with yellow fever virus, or to protect against the disease those who live in foci of the disease and are liable to be bitten by

(*) Received for publication 12 February, 1931.

infected mosquitoes. Here, in Rio, the number of persons protected by such a mean amounts to 200, and among them there was no case of yellow fever. The dose of serum varied between 1 and 4 cc.

———

The method of vaccination against yellow fever by means of vaccines prepared with emulsions of organs of infected monkeys is that which, up to now, has been the most widely employed in clinical practice and laboratory experience.

The method was set out by Hindle, and was also used by us, Petit, and Stephanopoulos, Lemos Monteiro and other researchers. Before then, the French Commission had verified that the heated serum of a yellow fever patient in the first days of disease, i. e. when still containing the virus, has a vaccinating action, when inoculated into a non-immune individual. The vaccination with organs of infected monkeys had been fairly widely experimented, not only in the laboratory but also in clinical practice.

At the beginning, the results of its employement in the laboratory and in man, were fairly encouraging, but after its use was made on a large scale, its action revealed itself to be somewhat irregular. In certain cases the immunity obtained was very good, while it failed in others, which fact might be imputed to insufficiency of the dose used (2 cc. in man) and possible immunizing variations of the different emulsions employed. The human vaccinations applied here, during the epidemic outbreak of 1928-1929, amounted to about 25 thousand.

As this method of vaccination still continues to be studied in laboratory, it is possible that new technical processes and a still greater experience may render its action more efficient, in animal as well as in man.

———

The vaccination with serum-virus is a method of immunization against yellow fever which we have been trying for some time and, judging from the experiments up to now performed, we believe that it may give sure and useful results in practice.

Two elements are necessary in order to wake the vaccinations by this method: a serum endowed with immunizing properties against yellow fever and the virus of that disease. The serum to be used may come from a man recovered from yellow fever as well as from a monkey also recovered from that disease. The process being very practical, it is explicitly recommendable to employ the hyperimmunization of the givers of serum

(man or monkey) with the aid of successive inoculations of virulent blood by the bite of infected mosquitoes.

The virus necessary to complete the immunization by this process has to be that which exists in blood of infected monkeys; the latter, when dried and kept at low temperature, is preserved from alteration for about one year. Therefore the virus can be easily transported anywhere; it is only necessary to dilute it on the occasion of its employment.

The practical performance of the process is of the great simplicity; it consists in inoculating 1 or 2 cc. of serum into a monkey and 24 hours afterwards 0,1 cc. of virus (blood at natural state or a corresponding dilution of dried blood). One cubic centimeter of blood, by drying, is reduced to 0,165 grs. of dry material, and 0,1 cc. of blood to 0,016 grs. In man, the dose of serum to be used has to be 4 cc. and that of virus must not exceed 0,1 cc., which dose revealed itself to be perfectly tolerated by monkeys. Twelve days after the vaccination with serum-virus, it is commendable to repeat the inoculation of the same quantity of virus (0,1 cc.) in order to reinforce the first immunization. Our experience showed that even several months after the employment of the vaccination by the serum-virus the immunization of monkeys is fairly sure, inasmuch as, inoculating into them 0,1 to 1 cc. of virulent blood, they presented no reaction.

Consequently, the practical performance of the process does not present any insuperable difficulty, it only being necessary, in case of its wider employment, to organize a corp of serum givers, such as already exist in many countries for the prophylaxis of measles, etc., and a service for immunization of monkeys for the same purpose. Virus, under the form of dried blood, is very easily obtainable on a large scale, without any greater difficulty, on account of the small quantity required for use.

The technique of vaccination with serum-virus against yellow fever may be resumed as follows:

1º—Inoculation into a *rhesus* of 1 to 2 cc. of immunize human serum or of that from a monkey immune against yellow fever (4 cc. for a human individual).

2º—Inoculation 24 hours afterwards, into animal or man, of 0,1 cc. of virulent blood in its natural state or the corresponding quantity of diluted dry blood.

3º—Inoculation 12 days afterwards, into animal or man already vaccinated with serum-virus, of 0,1 cc. of virus in order to consolidate the immunization obtained.

The bases of the process of vaccination with serum-virus against

yellow fever being thus established, we pass to report the experiments upon which we are basing our process, as it is here explained.

EXPERIMENT I

Rhesus 160.—Inoculated on 19-IX-28 with 2 cc. of serum from a boy (H.) suspected of having suffered from yellow fever (protective test) and on the next day with 0,1 cc. of an emulsion of virulent liver from a *rhesus* monkey. Temperatures: 19-IX, 39°; 20-IX, 38°8,; 21-IX, 39°,5; 22-IX, 39°; 23-IX, 38°,7; 24-IX, 39°,4; 25-IX, 39°; 26-IX, 39°; 27-IX, 39°,4; 28-IX, 39°,5; 29-IX, 39°,2; 30-IX, 39°,3. Afterwards, the animal continued keeping well, the protective test performed confirming that the case under study was one of yellow fever. The observation of the animal was then interrupted and on 2-IV-29, i. e. more than 6 months afterwards, it was inoculated with 1 cc. of virulent blood from *rhesus* 359 which was fatal for other monkeys. Temperatures: 2-IV, 39°,3; 3-IV 39°,4; 4-IV, 39°,3; 5-IV, 39°,5; 6-IV, 39°,5; 7-IV, 39°,5; 8-IV, 39°,2; 9-IV, 39°; 10-IV, 39°,8; 11-IV, 39°; 12-IV, 39°,6. The animal continued keeping well, thus proving that the initial vaccination with serum-virus had conferred a very solid immunity on it.

EXPERIMENT II

Rhesus 213.—Inoculated on 23-XI-28 with 2 cc. of serum from a man (F.) suspected of having suffered from yellow fever (protective test) and on the next day with 0,1 cc. of an emulsion of virulent liver from *Macacus rhesus*. Temperatures: 23-XI, 39°; 24-XI, 39°,2; 25-XI, 39°,7; 26-XI, 39°,1; 27-XI, 39°; 28-XI, 38°,9; 29-XI, 38°,5; 30-XI, 39°,4; 1-XII, 39°,2; 2-XII, 39°,3; 3-XII, 39°,2. Afterwards, the animal continued keeping well, the protective test performed confirming that the case under study was one of yellow fever. On 8-XII-28, the animal was inoculated with 0,1 cc. of virulent blood from *rhesus* 212 which killed other monkeys. Temperatures: 8-XII, 39°,1; 9-XII, 39°; 10-XII, 39°,6; 11-XII, 39°,3; 12-XII, 39°,2; 13-XII, 38°,9; 14-XII, 39°,3; 15-XII, 39°,4; 16-XII, 39°,2. After this second inoculation of virus, the animal always was keeping well, proving, as the precedent monkey, that the initial vaccination with serum-virus had conferred on it a sure immunity against yellow fever.

EXPERIMENT III

Rhesus 626.—Inoculated with 2 cc. of serum from *rhesus* 12 (hyperimmunized) subcutaneously on 21-XII and on the next day with 0,1

cc. of virulent blood from *rhesus* 620. Temperatures: 21-XII, 39°,1; 22-XII, 39°; 23-XII, 39°,2; 24-XII, 39°,6; 25-XII, 39°,5; 26-XII, 39°,8; 27-XII, 39°,9; 28-XII, 39°,6; 29-XII, 39°,4; 30-XII, 39°; 31-XII, 39°. The animal continues without alteration until 27-1-30, when it was inoculated with 1 cc. of virulent blood from *cynomolgus* 644. Temperatures: 27-I, 39°,1; 28-I, 39°; 29-I, 38°,8; 30-I, 39°; 31-I, 38°,9; 1-II, 39°,1; 2-II, 39°,2; 3-II, 39°,5; 4-II, 39°,5; 5-II, 39°,4; 6-II, 39°,3; 7-II, 39°,5. On 8-II-30 the temperature of the animal rises to 39°,8, on the next day to 39°,9, later on to 40° and so it continues until the 15-II-30, when the animal is sacrificed; it is then verified that it presents bronchopneumonia, tuberculous foci, but no lesions of yellow fever; this proves that the immunization by vaccination of serum-virus in this case was complete and sure as it was showed by an ulterior inoculation of pure virus.

EXPERIMENT IV

Rhesus 785.—Inoculated subcutaneously with 1 cc. of a mixture of serum hyperimmunized *rhesus* (ns. 12 and 20) on the 20-X-20 and on the following day with 1 cc. of a dilution of dry blood corresponding to 0,1 cc. of fresh blood. Temperatures: 20-X, 39°,2; 21-X, 39°; 22-X, 39°; 23-X, 39°,3; 24-X, 39°,4; 25-X, 39°,5; 26-X, 39°,6; 27-X, 39°,4; 28-X, 39°,6. The monkey did not present any reaction until the 26-XII-30, when it was inoculated again with 1 cc. of a dilution of dry virulent blood corresponding to 0,1 of fresh blood. Temperatures: 26-XII, 38°,4; 27-XII, 38°,3; 28-XII, 38°,1; 29-XII, 38°,4; 30-XII, 39°,8; 31-XII, 38°,6; 1-1-31, 38°,4; 2-I, 38°,8. The monkey, perfectly well remained as it can be seen and resisted to an new inoculation of virus, thus proving to be firmly immunized.

EXPERIMENT V

Rhesus 786.—Inoculated subcutaneously with 2 cc. of a mixture of serum from 2 individuals recovered from yellow fever on 20-X-30 and on the next day with 1 cc. of a dilution of dry blood corresponding to 0,1 cc. of fresh blood. Temperatures: 20-X-30, 39°,3; 21-X, 39°,5; 22-X, 39°,3; 23-X, 39°,4; 24-X, 39°,1; 25-X, 39°; 26-X, 39°,2; 27-X, 39°,1; 28-X, 39°,3. The *rhesus* did not present any alteration until the 26-XII-30, and on that day it was again inoculated with virus: 1 cc. of a dilution of dry blood corresponding to 0,1 cc. of fresh blood. Temperatures: 26-XII, 38°,4; 27-XII, 38°,1; 28-XII, 38°,6; 29-XII, 38°; 30-XII, 38°,5; 31-XII, 38°; 1-I-31, 37°,9; 2-I, 37°,8. Just as in the case of the precedent mon-

key, this one resisted perfectly against a new inoculation of virus, proving the solidity of immunization conferred on it by the initial vaccination with serum-virus.

VARIOUS EXPERIMENTS

Apart from the experiments mentioned in detail above, which bring into evidence the advantages of the serum-virus vaccination by the technique used, as a means of obtaining a sure immunity aigainst yellow fever, we had occasion to perform some more experiments with various objectives, which we will here briefly mention, although they do not present any greater importance:

1º.—Experiments with vaccination of serum, using a smaller quantity of serum, intravenously. We inoculated into the vein of *rhesi* (605 and 606) 0,5 cc. of serum from a hyperimmunized monkey and 24 hours afterwards 0,1 cc. of virulent blood. Both animals tolerated the injection of virus, but the second had some fever reactions between 40 and 41 degrees, during 4 days, after which it returned to its normal state. The two monkeys inoculated again, 22 days afterwards, with a new dose of 0,1 cc. of virulent blood, presented again fever reactions during some days, after which they returned to their normal state. A new inoculation into *rhesus* 605 of 2 cc. of virulent blood proved that the immunization of that animal was solid, since it did not present any reaction.

2º—Experiments performed with small quantities of serum from animal hyperimmunized against yellow fever. Some experiments made with vaccination of serum-virus, using 0,01, 0,1, 0,5, 1 and 2 cc. in order to verify which could be the minimal quantity necessary to protect and to immunize a *rhesus* against yellow fever, proved that the animals invariably presented a reaction, except with 1 cc. or more serum. With 0,5 cc., there are still fever reactions, and with 0,01 and 0,1 cc. the animals succumb to yellow fever. So, the dose of 1 cc. has to be considered as the useful one for monkeys, while, for man, we should use not less than 4 or 5 cc. of serum coming from an individual recovered from yellow fever or from a hyperimmunized monkey.

3º—Apart from the serum of man and of monkey, we tried to verify, whether the same results could be obtained by using serum from horses immune against yellow fever, a circumstance which would be of great advantages in practice; but the results, infortunately, were not good, owing to the weak protective power of the serum used.

4º—Some experiments were made by substituting the injections of serum and virus on different days with simultaneous subcutaneous in-

jections of both elements in different parts of the body of the same animal, or by using mixtures of serum (0,5 cc.) and virus (0,1 cc.) subcutaneously. In both cases the animals, though having resisted against the inoculations, presented fever reactions, more or less protracted, so that a favourable result perhaps might be obtained by this process only by the use of greater quantities of serum.

CONCLUSIONS

Examining the results, up to now obtained by the use of the vaccination with serum-virus in yellow fever, we believe we may admit that the process is of easy performance in practice, that it confers a sure immunization on the animals on which it is used, and that in the practice of human vaccination it will give the results which are hoped from this method.

The facility in the transport of the serum and the dry virus from one place to another will secure to this process the possibility of its employment in any place, wherever this method of protection becomes necessary.

We hope that the divulgation of the method will induce the trial of the same in the different centres of yellow fever research.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.